

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

FERNANDA ROSENE MELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERMAIS
HUMANAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* EM
MODELO DE LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA EM
RATOS

Florianópolis

2014

Fernanda Rosene Melo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERMAIS HUMANAS: ESTUDOS *IN VITRO* E
IN VIVO EM MODELO DE LESÃO MEDULAR
TRAUMÁTICA EM RATOS

Tese submetida ao Programa
de Pós-graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento
da Universidade Federal de
Santa Catarina, para obtenção
do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Andréa
Gonçalves Trentin

*Dedico este trabalho à minha família,
com amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Andréa Trentin, pela oportunidade que me propiciou, pela orientação, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Um exemplo de dedicação!

Aos professores do laboratório Márcio Alvarez, Giordano Calloni e Ricardo Garcez, por todo incentivo e ensinamentos ao longo desses anos.

Aos pacientes que tornaram possível este projeto ao doarem os fragmentos de pele, ao Dr. Rogério Gomes e à equipe do Hospital e Maternidade Ilha, por viabilizarem a coleta do material.

Ao Prof. Dr. Giles A. Rae, do Laboratório de Peptídeos, do Departamento da Farmacologia – UFSC, e às doutorandas Stefânia Forner e Alessandra Martini pela colaboração nos experimentos *in vivo*.

Aos profissionais da UFSC que, através das suas diversas funções, contribuíram de forma indireta para a concretização deste trabalho.

Às pessoas especiais que encontrei no LACERT ao longo desses 10 anos. Alguns já partiram em busca de novos caminhos, outro ainda permanecem. Cada um de vocês, sem dúvida, teve uma participação fundamental nessa jornada, desde os valiosos ensinamentos, das contribuições teóricas e práticas, dos momentos de descontração, companheirismo e amizade. Principalmente pela amizade, tenho certeza que conquistei amigos para toda uma vida. Obrigada à todos vocês!

Aos meus amigos queridos, que não poderei nomear individualmente. Obrigada por fazerem parte da minha vida e pelo apoio, essencial na realização deste projeto.

À minha família, o motivo de eu estar aqui, pelo exemplo de amor e união e pelo incentivo constante. Ao meu irmão, pelo companheirismo e amizade. E principalmente aos meus pais Samuel e Fátima, pelo amor incondicional, pelo esforço, apoio e carinho em todos os momentos, por me fazerem acreditar em mim mesma. Obrigada por toda a dedicação e exemplo!

Ao meu noivo Jairo, por todo amor, compreensão e apoio. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor e mais feliz. Te amo!

*“Estamos na situação de uma
criancinha que entra em uma
imensa biblioteca, repleta de
livros em muitas línguas. A
criança sabe que alguém deve
ter escrito aqueles livros, mas
não sabe como. Não
compreende as línguas em que
foram escritos. Tem uma
pálida suspeita de que a
disposição dos livros obedece
a uma ordem misteriosa, mas
não sabe qual ela é.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) adultas abrangem uma população de células que pode ser isolada a partir de vários órgãos e tecidos que têm sido sugerida como uma fonte atrativa de células para a engenharia de tecidos em razão da sua multipotencialidade e capacidade de liberação de moléculas ativas. Representam assim uma fonte promissora de células para o tratamento de lesão da medula espinhal, uma desordem neurológica que compromete funções motoras, sensoriais, reflexas e autonômicas. As CTM derivadas da derme humana apresentam a capacidade de se diferenciar em células das linhagens mesenquimal e ectodérmica *in vitro*. Neste trabalho, investigamos o potencial neural de CTM da derme humana (CTMD). A expressão espontânea de marcadores neurais por CTM tem sido considerada uma demonstração da sua predisposição para originar linhagens neurais. Neste trabalho, demonstramos que as CTMD expressam marcadores neurais *in vitro*, em meio de cultivo padrão e *in vivo*, em modelo animal de lesão de medula espinhal. Uma vez que a combinação do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento do fibroblasto tipo 2 (FGF2) é mitogênica e promove o comprometimento neuronal de diversas populações de células-tronco, avaliamos seus efeitos em estimular o potencial neuronal das CTMD *in vitro*. O tratamento com a combinação de EGF e FGF2, promoveu um aumento na proporção de células que expressam marcadores de pluripotência, marcadores neurais precoces e marcadores neuronais e gliais, em detrimento da expressão de marcadores mesenquimais. Além disso as CTMD responderam a estímulos neurogênicos, aumentando a expressão de proteínas neuronais específicas, e reduzindo a expressão de marcadores neurais precoces e marcadores gliais. Ademais, as CTMD promovem a recuperação funcional locomotora

parcial em ratos com lesão da medula espinhal, e sobrevivem no tecido medular. Portanto, as CTMD apresentam potencial neural *in vitro* e *in vivo*, que pode ser explorado em terapia para a regeneração da lesão medular, e possivelmente como complemento a outras terapias.

ABSTRACT

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) correspond to a cell population isolated from several organ and tissues that represent an attractive source of cells for tissue engineering due to their multipotentiality and ability to release active molecules. MSCs derived from human dermis (DMSCs) are able to differentiate into mesenchymal and ectodermal cell lineages *in vitro*. In this study, we have investigated the neural potential of DMSCs. The expression of neural markers by MSCs has been considered a demonstration of their predisposition to differentiate towards neural lineages. Here we show that human DMSCs express *in vitro* and *in vivo* neural markers. Since the combination of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor type 2 (FGF2) promotes the neural commitment of stem cells, we examined its effects in the neuronal potential of DMSCs. The treatment with the combination of EGF and FGF2 increased the proportion of cells positives for pluripotency and neural (neuronal and glial) markers and reduced those expressing the smooth muscle marker. Moreover, DMSCs were able to respond to neurogenic stimulation expressing neuronal specific proteins, at the expense of early neural and glial markers. Furthermore, DMSCs are able to survive and integrate into the spinal tissue partially recovering spinal cord injured rats. Therefore, DMSCs represent an attractive source of cells for therapy of spinal cord injuries and possibly also for other therapies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática das três camadas que compõem a pele.	20
Figura 2. Potenciais mecanismos de reparo da lesão medular após transplante com células tronco.....	26
Figura 3. Representação esquemática da metodologia de diferenciação neural aplicada neste estudo.	34
Figura 4. Caracterização das CTMD.	41
Figura 5. Expressão de marcadores de (A-C) pluripotência, (D-I) neurais e (J) mesenquimais pelas CTMD em meio padrão.	44
Figura 6. Expressão de marcadores neurais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural.	46
Figura 7. Expressão de marcadores neuronais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural.	47
Figura 8. Expressão de marcadores gliais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural.	48
Figura 9. Avaliação locomotora pela escala bbb dos animais submetidos a lesão medular e inoculados com CTMD em relação ao tempo pós-cirurgia.....	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 10. Análise imunoistológica das CTMD 60 dias após lesão medular.	51
Figura 11. Fotomicrografia de contraste de fase de culturas de CTMD em meio contendo EGF e FGF2.	53
Figura 12. Avaliação das esfera de CTMD cultivadas em meio contendo EGF e FGF2.	54
Figura 13. Análise fenotípica das esferas de CTMD cultivadas em meio contendo EGF e FGF2	55
Figura 14. Análise da expressão de marcadores de pluripotência pelas CTMD aderentes cultivadas em meio contendo EGF e FGF2..	57
Figura 15. Análise da expressão de marcadores de precursores neurais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2.	58

Figura 16. Análise da expressão de marcadores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2.....	59
Figura 17. Análise da expressão de marcadores gliais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2.....	60
Figura 18. Análise da expressão do marcador muscular liso (α sma) pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2.	61
Figura 19. Análise da expressão dos marcadores de progenitores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural. .	63
Figura 20. Análise da expressão dos marcadores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural.....	64
Figura 21. Análise da expressão dos marcadores gliais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de marcadores de estágios da diferenciação celular.....	19
Tabela 2. Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo.....	31
Tabela 3. Anticorpos primários utilizados na análise de Imunofluorescência	35
Tabela 4. Anticorpos secundários utilizados na análise de Imunofluorescência	36

ABREVIACÕES

α-SMA	Actina de músculo liso tipo alfa
ANOVA	Análise de variância
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
b-HLH	Básica hélice-alfa-hélice
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CN	Crista neural
CNPase	2' 3' dinucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
CT	Célula tronco
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CTM	Célula tronco mesenquimal
CTMD	Célula tronco mesenquimal derivada da derme
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPI-NCSCs	Células tronco epidermais derivadas da crista neural
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos tipo 2
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAP43	Proteína associada a crescimento neuronal 43
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
IG	Imunoglobulina
IFN-γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina

MAP2	Protéina associada a microtúbulo tipo 2
NFM	Neurofilamento de cadeia média
NSE	Enolase específica de neurônio
NT-3	Neurotrofina-3
NGF	Fator de crescimento de nervo
p0	Proteína zero
p75NTR	Receptor de neurotrofina p75
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Ficoeritrina-cianina
SBF	Soro bovino fetal
SKPs	Precursos derivados da pele
SNC	Sistema nervoso central
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	CÉLULAS-TRONCO.....	14
1.1.1	Célula-tronco mesenquimal (CTM).....	14
1.1.3	EGF e FGF2 como moduladores do potencial neural de CT	22
1.2	LESÃO MEDULAR.....	24
1.3	JUSTIFICATIVA	27
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1	CULTURA DE CTMD HUMANAS	29
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CTMD HUMANAS	30
3.2.1	Imunofenotipagem.....	30
3.2.2	Ensaio de Diferenciação Celular	31
3.3	ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL	32
3.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA	34
3.5	LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA	36
3.5.1	Preparação e inoculação de CTMD	38
3.5.2	Parâmetros locomotores após a lesão medular	38
3.5.3	Estudos Histopatológicos	39
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

4. RESULTADOS	41
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CTMD HUMANA.....	41
4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO PADRÃO.....	42
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM MEIO INDUTIVO NEURAL	45
4.4 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM MODELO DE LESÃO MEDULAR.....	49
4.4.1 Análise histológica das CTMD na lesão medular	50
4.5 INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD POR EGF E FGF2.....	52
4.5.1 Estudo das esferas de CTMD em meio contendo EGF e FGF2	53
4.5.2 Estudo das CTMD aderentes em meio contendo FGF e FGF2.....	56
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. AS CTMD APRESENTAM POTENCIAL NEURAL EM CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO	71
5.2. AS CTMD APRESENTAM POTENCIAL NEURAL <i>IN VIVO</i> EM MODELO ANIMAL DE TRAUMA MEDULAR	73

5.3. O COMPROMETIMENTO NEURAL DA CTMD PODE SER ESTIMULADO <i>IN VITRO</i>	75
5.3.1. EGF e FGF2 estimulam o comprometimento neural das CTMD <i>in vitro</i>	76
5.3.2. Diferenciação neuronal das CTMD	79
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são definidas por sua capacidade de auto-renovação e de se diferenciar em diversos tipos celulares (LENSCH, DAHERON *et al.*, 2006). Elas são classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação celular em totipotentes (originam todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários), pluripotentes (originam todos os tipos celulares do embrião exceto os anexos embrionários) e multipotentes (potencial restrito a uma camada germinativa ou sub-linhagem) (WAGERS; WEISSMAN, 2004). As CT são classificadas ainda de acordo com sua origem em CT embrionárias, que são pluripotentes e correspondem à massa celular interna do blastocisto (THOMSON, 1998); e em CT adultas, que são multipotentes e encontradas em tecidos fetais e adultos. As CT adultas são comprometidas com tecidos ou órgãos específicos, sendo sua principal função a homeostase, manutenção e o reparo tecidual (SANDERS *et al.*, 2006). Além disso, apresentam alto potencial proliferativo (WISLET-GENDEBIEN, HANS *et al.*, 2005), que pode ser estimulado *in vitro* e *in vivo* por mitógenos e lesões (COTSARELIS *et al.*, 1999).

As CT são uma fonte atraente e promissora de células para a terapia celular e medicina regenerativa. Considerando que as CT embrionárias apresentam questionamentos éticos e biológicos (possibilidade de incompatibilidade imunológica e alto potencial carcinogênico) (ESPINOZA; PETERSON, 2012), muitos estudos vêm se dedicando às CT adultas. Estas não formam teratomas, não apresentam restrições éticas, e podem ser isoladas de tecidos autólogos, apresentando assim grande potencial de uso terapêutico (CHAGASTELLES; NARDI, 2011).

1.1.1 Célula-tronco mesenquimal (CTM)

As CTM foram descritas inicialmente na medula óssea de roedores, por Friedenstein e colaboradores (1968) como células fibroblastóides distinguidas das hematopoiéticas com rápida adesão à superfície plástica da placa de cultivo e com origem no compartimento

estromal. Além disso, são capazes de formar colônias a partir de células individuais e de se diferenciar em células com fenótipo mesenquimal como osteoblastos, condroblastos e adipócitos, sendo denominadas células estromais da medula óssea (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968). Mais tarde foram conceituadas por Caplan (1991) como "células-tronco mesenquimais".

CTM foram identificadas em quase todos os tecidos fetais e adultos, o que sugere uma distribuição ubíqua no organismo (APPAIX *et al.*, 2014). Além disso, devido à algumas populações de CTM possuírem localização perivascular, essas células têm sido relacionadas aos pericitos (CRISAN *et al.*, 2008). Este modelo de localização perivascular propõe que as CTM estabilizam os vasos sanguíneos e contribuem para a homeostase do tecido e do sistema imunológico sob condições fisiológicas, além de serem recrutadas durante o processo de reparo tecidual (CAPLAN, 2007). Desde modo, as CTM podem estar conectadas ao sistema imunológico e vascular, enfatizando o seu papel como um integrador fisiológico e sua importância no reparo ou regeneração tecidual (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

Atualmente, as CTM humanas são caracterizadas de acordo com os critérios definidos pelo *Comitê de Células-Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular*, segundo os quais as CTM devem (1) ser aderentes ao plástico em condições de cultivo padrão, (2) expressar os marcadores mesenquimais CD105, CD90 e CD73, (3) serem negativas para os marcadores hematopoiéticos CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, CD19 ou HLA-DR e (4) apresentar potencialidade de diferenciação celular em derivados mesenquimais como osteócitos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI *et al.*, 2006).

1.1.1.1 Propriedades imunomoduladoras das CTM

Além da multipotencialidade, as propriedades imunomoduladoras das CTM são igualmente promissoras para terapias regenerativas. Estas células são capazes de modular a resposta imune, inibindo a maturação de células dendríticas e suprimindo a função de linfócitos T, linfócitos B e células NK. Além disso, o CTM são consideradas hipoimunogênicas devido à baixa expressão de proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e nenhuma expressão de MHC classe II (TSE *et al.*, 2003; UCCELLI *et al.*, 2011).

Estas características de CTM são consideradas importantes para a terapia celular. De fato, a sobrevivência das CTM após o transplante, incluindo xenotransplante, tem sido demonstrada (WEI *et al.*, 2009; FIBBE *et al.* 2007; NAKAMURA *et al.*, 2007).

A secreção, pelas CTM, de fatores solúveis que atuam sobre o sistema imune, como TGF- β 1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10), indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO), entre outros, tem sido apontada como responsável pela propriedade imunomoduladora destas células (CHEN *et al.*, 2006; KRAMPERA *et al.*, 2006; MEISEL *et al.*, 2004).

1.1.1.2 Produção de fatores tróficos pelas CTM

Os efeitos tróficos das CTM são exercidos por uma ampla variedade de fatores, que secretados após o enxerto em tecidos danificados, reduzem a apoptose e melhoram a neovascularização, contribuindo assim para a proteção dos tecidos (NAKANO *et al.*, 2010; YOSHIHARA *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2007; CRIGLER *et al.*, 2006; MAHMOOD *et al.*, 2004). De fato, quando transplantadas em tecidos lesados ou em processos degenerativos, como acidente vascular cerebral ou lesão medular, as CTM migram para os locais de lesão e contribuem para a recuperação funcional e histológica (HARDY; MALTMAN; PRZYBORSKI, 2008).

Embora eventos de transdiferenciação e fusão celular possam contribuir para a melhora funcional, a baixa frequência com que ocorrem os torna incapazes de serem totalmente responsáveis pelos níveis de recuperação que têm sido observados em sistemas neurodegenerativos. O conceito de que as CT simplesmente se diferenciam em tipos celulares maduros em resposta a sinais indutivos continua a ser testado, sugerindo que elas possam responder às mudanças em seu nicho através da liberação e/ou absorção de fatores tróficos e citocinas. A perspectiva comum é a de que as CTM sejam capazes de amenizar danos neurais após o transplante, através de mecanismo parácrino, liberando fatores tróficos e citocinas, que agem nas CT residentes e em células progenitoras neurais, promovendo um processo de reparo endógeno no SNC do hospedeiro (CHEN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2005).

As CTM produzem e secretam uma série de fatores neurotróficos e de crescimento, incluindo o fator de crescimento do nervo (NGF), fator

neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), neurotrofina-3 (NT-3), fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator neurotrófico ciliar (CNTF), tanto *in vitro* como *in vivo* (CHEN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2002). O efeito de tais fatores pode ser classificado em 5 categorias principais: angiogênicos, neurogênicos, neuroprotetores, sinaptogênicos e inibidores da formação de cicatrizes (CHEN; CHOPP, 2006). Além disso, as CTM têm sido relacionadas com a secreção de interleucina e moléculas de matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina e laminina, que podem alterar o nicho das CT neurais residentes (CHEN *et al.*, 2007). Parece provável que uma combinação de fatores, seja responsável por facilitar a recuperação neural mediada pelas CTM *in vivo* (HARDY; MALTMAN; PRZYBORSKI, 2008).

Todas essas características somadas à rápida expansão *in vitro*, e facilidade no isolamento, cultivo e manutenção em cultura tornam as CTM uma fonte promissora para o tratamento de uma ampla gama de doenças (NARDI; MEIRELLES, 2006). Entretanto, a promessa da medicina regenerativa baseada em CTM depende da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e medeiam a diferenciação em linhagens específicas, o estabelecimento destas células em tecidos de interesse, e as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação celular (BYDŁOWSKI *et al.*, 2009). Estes mecanismos são em grande parte desconhecidos, o que faz com que as aplicações clínicas e terapêuticas de CTM ainda sejam incertas (BYDŁOWSKI *et al.*, 2009).

1.1.1.3 O potencial neural das CTM

Além do potencial mesenquimal descrito acima, as CTM podem gerar células com características não-mesenquimais, como as neurais (OKOLICSANYI; GRIFFITHS; HAUPT, 2014). As CTM humanas produzem *in vitro* esferas semelhantes às formadas pelas CT neurais (HERMANN *et al.*, 2004). Além disso, Alexanian e colegas (2010) relataram uma diferenciação neuronal direta tratando as CTM humanas com inibidores da metilação de DNA e desacetilação de histonas e agentes farmacológicos que promovem o aumento do cAMP intracelular. A diferenciação neural de CTM tem sido sugerida ainda *in vivo* após inoculação no ventrículo lateral (KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999;

e REYES and VERFAILLIE, 1999). Outros protocolos demonstram que a superexpressão de Mash1, fator de transcrição essencial na especificação de linhagens neuronais (BERTRAND *et al.*, 2002; ROSS *et al.*, 2003), em CTM da medula óssea é capaz de diferenciá-las em neurônios gabaérgicos (WANG *et al.*, 2013). Além disso, tem sido relatada a formação de diferentes linhagens neuronais na presença de mash-1, associada à co-expressão de outros fatores neuronais (PANG *et al.*, 2011; VIERBUCHEN *et al.*, 2010; MARRO *et al.*, 2011).

Trabalhos utilizando meio condicionado de CTM do tecido adiposo sugerem que estas células foram capazes de secretar fatores que protegem neurônios corticais contra apoptose e danos causados pela excitotoxicidade pelo glutamato, pelo aumento da expressão de GAP43 nesses neurônios (HAO *et al.*, 2014). GAP43 é uma proteína expressa principalmente em axônios e terminais pré-sinápticos (BENOWITZ *et al.*, 1987). É particularmente abundante em períodos de crescimento de neuritos, e considerado um marcador de regeneração axonal (AOKI *et al.*, 2007) e de restauração neural (LOPATINA *et al.*, 2011).

Os protocolos descritos na literatura para a diferenciação das CTM em neurônios e células gliais envolvem tanto a conversão direta nestes tipos celulares, quanto uma etapa intermediária envolvendo a formação de esferas contendo células semelhantes às CT neurais (ALEXANIAN, 2010; HERMANN *et al.*, 2004). O processo de diferenciação neural é acompanhado pela expressão de marcadores moleculares e/ou proteicos, como de CT neurais (Nestina, p75, Mash, Foxd3), de neurônios (proteínas de neurofilamento, β -tubulina III, MAP2, GAP43), de astrócitos (GFAP), oligodendrócitos (CNPase) e mielina de nervo periférico (p0) (MUNDELL; LABOSKY, 2011, JANG *et al.*, 2010; FRANCO LAMBERT *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2007; NAGAI *et al.*, 2007 MARESCHI *et al.*, 2006; ROSS; GREENBERG; STILES, 2003; PEIRANO *et al.*, 2000) (Tabela 1).

Tabela 1. Painel de marcadores de estágios da diferenciação celular.

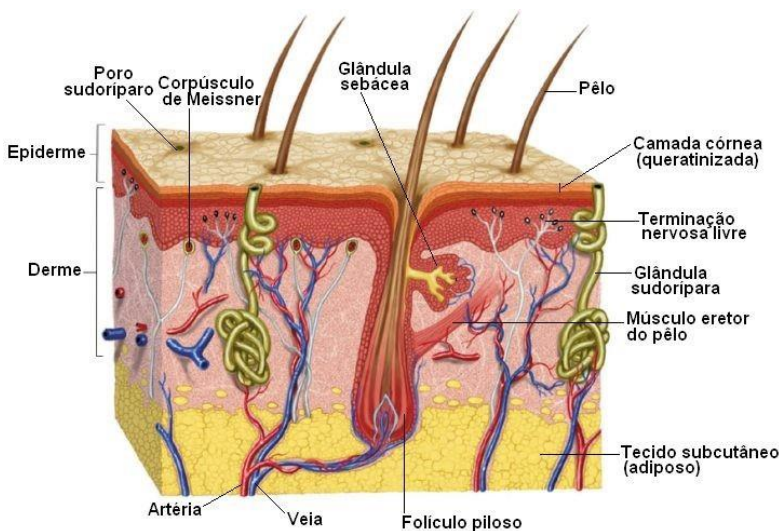
Marcador	Pluripotência	Neural	Neuronal	Glial	Mesenquimal
Sox2	X	--	--	--	--
Oct4	X	--	--	--	--
Nanog	X	--	--	--	--
Nestina	--	X	--	--	--
p75NTR	--	X	--	--	--
FoxD3	--	X	--	--	--
Mash1	--	X	--	--	--
β -tub III	--	--	X	--	--
NFM	--	--	X	--	--
NSE	--	--	X	--	--
MAP2	--	--	X	--	--
GAP43	--	--	X	--	--
GFAP	--	--	--	X	--
CNPase	--	--	--	X	--
Proteína zero	--	--	--	X	--
α - SMA	--	--	--	--	X

A pele é o maior órgão dos mamíferos, atuando na interface com o ambiente externo (Fig.3). Além de fornecer barreira química e mecânica, a pele medeia respostas sensoriais e reações imunológicas.

A camada superficial, a epiderme, é derivada da ectoderme, enquanto o tecido subjacente, a derme, é originado da mesoderme.

A derme situa-se logo abaixo da epiderme e é responsável pela elasticidade e pela integridade mecânica da pele. Nesse tecido encontram-se os anexos epidérmicos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de vasos sanguíneos e nutrientes, os quais são responsáveis também pela nutrição e manutenção da epiderme. A principal célula que constitui a derme é o fibroblasto, que sintetiza colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos. Células do sistema imune e células do endotélio vascular também estão presentes em abundância (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012; DRÉNO, 2008; KUMAR *et al*, 2005). A interação entre os componentes celulares da epiderme e da derme é crítica para a função da pele e para o desenvolvimento e no organismo adulto (MILLAR, 2005).

Figura 1. Ilustração esquemática das camadas que compõem a pele. Epiderme e derme.



Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>

A pele possui capacidade de renovação e de regeneração durante toda a vida do indivíduo como resultado da atividade das CT que contém (ADOLPHE e WAINWRIGHT, 2005). Diversas populações de CT têm sido isoladas da pele, como as CT epidérmicas, na camada basal do epitélio interfolículo; as SKP (*skin-derived precursors*), na região do bulge do folículo piloso (BLANPAIN; FUCHS, 2006) ou na papila dérmica (AL-NBAHEEN *et al.*, 2012; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012a), as EPI-NCSC (*epidermal-neural crest stem cells*) (BRESSAN *et al.*, 2014, Sieber-Blum *et al.*, 2004) e as CTM na derme (CRIGLER *et al.*, 2007; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012b).

A existência de CTs dérmicas permanece pouco compreendida. Estudos recentes têm sugerido nichos distintos de CTs dérmicas, como na papila dérmica do folículo piloso, em regiões perivasculares e na matriz extracelular. Estas células possuem características fenotípicas e potencialidades distintas, inclusive para fenótipos das endodérmicas, mesodérmicas e ectodérmicas (CHEN *et al.*, 2007; LYSY *et al.*, 2007). As CT dérmicas podem se diferenciar *in vitro* em adipócitos, osteócitos e condrócitos e possuem marcadores de superfície semelhantes às CTM da medula óssea (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012).

As SKP foram isoladas e expandidas da pele de roedores e humanos e diferenciadas para derivados mesodérmicos e neurais, incluindo células que normalmente não são encontradas na pele, como neurônios e células gliais (TOMA *et al.*, 2001). Elas podem crescer em esferas que se auto-renovam, expressam o marcador de células progenitoras neurais Nestina e apresentam inúmeras semelhanças com as CT da CN (FERNANDES *et al.*, 2004). As SKP são capazes de se diferenciar em células de Schwann em resposta a fatores neurais apropriados e, quando transplantadas em lesão de nervo periférico ou no SNC, promovem a remielinização de fibras nervosas e regeneração funcional (BIERNASKIE *et al.*, 2007; MCKENZIE *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2010). O potencial esqueletogênico dessas células foi explorado em modelo de fratura óssea, onde, após transplantadas, foram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica e contribuir para a reparação óssea (LAVOIE *et al.*, 2009). Estudo recente mostrou que as SKP são distintas das CTM, apesar de compartilharem potencial de diferenciação semelhante (JINNO *et al.*, 2010).

As EPI-NCSC foram descritas por Sieber-Blum e colaboradores como células multipotentes, encontradas na região do bulge do folículo piloso adulto. Essas células foram isoladas em virtude da habilidade migratória que exibem quando cultivadas, e a sua origem na CN foi comprovada em camundongos transgênicos *Wnt1-CRE/R26R* (SIEBER-BLUM *et al.*, 2004). Essas células apresentam um amplo potencial de diferenciação, incluindo quase todos os fenótipos derivados da CN. Quando submetidas a análises clonais *in vitro*, as EPI-NCSC dão origem a células que expressam marcadores de neurônios, de células gliais, de células de músculo liso e de melanócitos. Na presença de Neuregulina-1, as EPI-NCSC originam precursores de células de Schwann e, na presença de EGF e FGF2 e meio indutivo neural, expressam os marcadores neuronais mash-1, β -tubulina III e GAP43 (BRESSAN *et al.*, 2014, DELFINO-MACHIN *et al.*, 2007). Por serem consideradas promissoras para aplicações em medicina regenerativa, trabalhos recentes têm focado no isolamento e cultivo de EPI-NCSC a partir de pele humana (CLEWES *et al.*, 2011; KREJCI; GRIM, 2010). Estes trabalhos demonstraram que as EPI-NCSC humanas, assim como as murinas, expressam marcadores da CN e marcadores característicos de CT embrionárias, como Nanog, Oct-4 e Sox2, além de apresentar potencial para gerar osteócitos, condrócitos, melanócitos, neurônios, células de músculo liso células de Schwann, e serem capazes de se autorrenovar *in vivo*.

1.1.3. EGF e FGF2 como moduladores do potencial neural de CT

A conversão de CTM em esferas semelhantes às das CT neurais ocorre em condições de cultivo não aderentes e na presença dos fatores de crescimento EGF e FGF2 (HILL *et al.*, 2012). Este método permite a obtenção das três linhagens neurais (neuronal, astrocitária e oligodendrocitária) ao contrário da diferenciação direta que é restrita a uma dessas três linhagens (HERMANN *et al.*, 2004). Esferas positivas para Nestina, obtidas a partir de CTM derivadas de medula óssea e de tecido adiposo revelaram a expressão molecular de Nestina, β III-tubulina, NCAM, Oct4 e Sox2 tanto nas CTM quanto nas esferas correspondentes. A análise de imunofluorescência detectou a expressão dos marcadores neuronais β -tubulina III (marcador de neurônios imaturos), NF200 (filamento intermediário axonal), MAP2 (proteína associada à microtúbulos envolvida com o crescimento de neuritos) e

NSE (enzima glicolítica encontrada em neurônios e células neuroendócrinas) nas células com características semelhantes a neurônios (YANG *et al.*, 2010; PERROT *et al.*, 2008, KAECH *et al.*, 1996).

A combinação de EGF e FGF2 tem sido extensivamente utilizada para isolar e cultivar CT neurais do SNC em desenvolvimento e adulto (POLLARD *et al.*, 2006; REYNOLDS; WEISS, 1992), bem como para expandir culturas puras de precursores neurais derivados de CT embrionárias (CONTI *et al.*, 2005).

Os fatores de crescimento EGF e FGF2 são capazes de estimular a proliferação de uma grande variedade de células (COUTU; GALIPEAU, 2011). Muitos trabalhos descrevem que são capazes de aumentar a sobrevivência de progenitores neurais *in vitro*, como também estimular diferentes respostas celulares durante os estágios do desenvolvimento neural (WALDER; FERRETTI, 2004). Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram em modelo de aves que o FGF2 estimula a renovação e a proliferação de precursores indiferenciados e multipotentes da crista neural (CN), mantendo-os indiferenciados ao mesmo tempo que estimula a potencialidade glial (BITTENCOURT *et al.*, 2013; GARCEZ *et al.*, 2009). EGF, por outro lado, direciona as células da CN a assumirem características neuronais e melanocíticas (GARCEZ *et al.*, 2009). Jeremias (2009) sugere ainda que FGF2 mantenha CTM de placenta em estado indiferenciado e de alta proliferação, enquanto o EGF leva ao comprometimento com a linhagem neural, embora não seja capaz de induzir a diferenciação final dessas células. Em adição, trabalho de investigação em CTM da polpa dentária humana realizado por DUARTE (2010) mostrou que estas se mantêm em um estado neural mais indiferenciado na presença de EGF e FGF2 sugerindo que estes fatores podem modular o potencial neural destas células.

Além disso, resultados obtidos por Toma e colaboradores demonstram que a presença de EGF e FGF2 no meio de cultivo é indispensável para a obtenção e manutenção, sem perda de potencialidade, de células precursoras da pele humanas (SKP) (TOMA *et al.*, 2005). O estudo com células induzidas de multilinhagens adultas isoladas de medula óssea (*human marrow isolated adult multilineage inducible cells* - MIAMI cells) demonstrou que o pré-tratamento com EGF e FGF2 promoveu a especificação das células para uma linhagem neuronal e aumentou seu programa de diferenciação

neuronal *in vitro* (DELCROIX *et al.*, 2010). Em trabalho recente do nosso grupo, o tratamento simultâneo com EGF e FGF2 foi capaz de estimular a proliferação celular e, conseqüentemente, a expansão em cultivo de CT epidérmicas derivadas da CN. Ao mesmo tempo, o tratamento com esses fatores de crescimento mantiveram a expressão de marcadores moleculares associados ao estado indiferenciado e multipotente de células da CN (BRESSAN *et al.*, 2014).

1.2 LESÃO MEDULAR

Os registros mais antigos de lesão medular datam de 1700 a.C, de um livro de medicina egípcio, o papiro de Edwin Smith, onde é relatada com uma “doença sem tratamento” (PORTER, 1996). Atualmente, quase 4000 anos depois, o tratamento para este tipo de insulto permanece paliativo (SILVA *et al.*, 2013). As lesões medulares acarretam alterações físicas e emocionais no paciente, prejudicando o funcionamento de vários órgãos e sistemas. Ademais, a lesão medular resulta em reflexos no meio sócio familiar no qual o paciente está inserido e constitui um desafio à reabilitação. O tratamento é caro, contínuo e não apresenta resolução adequada (MEYER *et al.*, 2003). Anualmente milhares de indivíduos de todas as faixas etárias são acometidos pela doença, com elevadas taxas de mortalidade e morbidade crônica (SILVA *et al.*, 2013).

O déficit neurológico decorrente da lesão da medula espinhal advém da somatória de dois eventos distintos: a lesão mecânica inicial (lesão primária) e a lesão secundária, a qual ocorre em consequência da primeira. A lesão primária é produzida pelo trauma em si, com morte celular e liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas, sendo, portanto, um processo mecânico que independe de controle celular (DUMMONT, 2001). Em seguida à lesão primária, inicia-se uma lesão endógena secundária caracterizada por aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, apoptose glial e neuronal, além de uma complexa resposta neuroinflamatória que persiste por meses ou anos após o trauma inicial (FLEMING *et al.*, 2006; DONNELLY *et al.*, 2008).

Em decorrência da lesão secundária, a medula espinhal também apresenta gliose reativa extensa em estágios mais avançados. Durante este processo, as ações dos astrócitos e de outros tipos celulares, incluindo as do sistema imune, criam um ambiente altamente desfavorável à

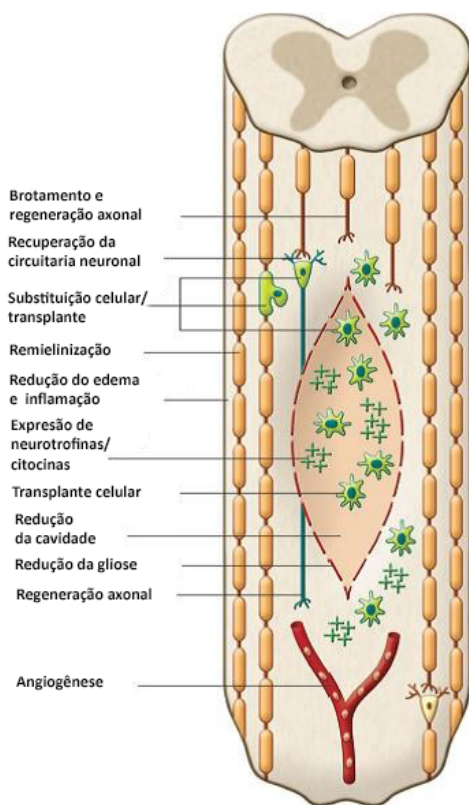
regeneração neuronal do local afetado pela lesão (PROFYRIS *et al.*, 2004). O recrutamento de neutrófilos em estágios iniciais e de macrófagos em estágios mais tardios da lesão medular leva à exacerbação da injúria neural. Mais adiante, o recrutamento de linfócitos T helper pode prover algum suporte trófico para reparos de componentes neuronais ou não-neuronais do tecido lesado. Os oligodendrócitos aparecem como células particularmente suscetíveis à injúria por lesão traumática medular, apresentando apoptose pronunciada, tanto nas adjacências, quanto em locais mais distantes ao sítio da lesão inicial. Esse processo, resulta no desenvolvimento de cistos e formação de uma cicatriz astrogliar. Uma das mudanças mais evidentes é a degeneração Walleriana, que representa a desintegração anterógrada dos axônios que foram seccionados após a lesão. Ela é caracterizada por bainhas de mielina fragmentadas e distorcidas, com alterações no axoplasma, resultando em uma deterioração da condutibilidade de axônios e declínio funcional adicional da neurotransmissão (NORENBERG *et al.*, 2004).

São inúmeros os obstáculos para a regeneração da lesão na medula, como a proliferação de fibroblastos, astrócitos, microglia e células endoteliais, formando a cicatriz neuroglial, que age como uma barreira físico-química; além de ausência das células de Schwann, que contribuiriam para guiar a regeneração axonal; a ausência de fatores neurotróficos para promover o crescimento axonal; a inibição do crescimento axonal, devido a alguns fatores liberados após a lesão (DIVANI *et al.*, 2007; CAO; FENG, 2009; HYUN; KIM, 2010).

Diante da complexa patogênese da doença, a caracterização dos mecanismos bioquímicos, moleculares e imunológicos desencadeados após a lesão da medula espinhal é crucial à identificação de alvos potencialmente importantes para intervenção terapêutica. Embora os resultados obtidos em modelos experimentais sejam promissores, as pesquisas em humanos ainda são limitadas. Neste contexto, diversas linhas de pesquisa têm explorado uma variedade de estratégias terapêuticas experimentais, incluindo agentes farmacológicos, ativação de macrófagos, implante de eletrodos, substâncias promotoras de remielinização e transplantes de CT (Figura. 2) (MOTHE; TATOR, 2012; REN; YOUNG, 2013; VARMA *et al.*, 2013). Neste sentido, as terapias celulares representam uma nova abordagem de tratamento de lesão medular (KWON *et al.*, 2013). Esse tipo de terapia abrange dois objetivos principais: a substituição de células perdidas ou lesionadas e a promoção

de um microambiente estimulatório da capacidade regenerativa e/ou protetora no interior da lesão (Figura 2) (SALEWSKI; EMRANI; FEHLINGS, 2013).

Figura 2. Potenciais mecanismos de reparo da lesão medular após transplante com CT. O diagrama apresenta alguns dos mecanismos potenciais do transplante celular, que incluem a substituição de oligodendrócitos ou neurónios por células transplantadas (em verde), a remielinização de axônios, restauração de circuitos neuronais, preservação de células neuronais e gliais hospedeiras, angiogênese, redução da inflamação ou gliose, estimulação de células precursoras endógenas, e a criação de um ambiente favorável para a plasticidade e regeneração axonal.



Fonte: Adaptado de MOTHE & TATOR, 2013.

1.3 JUSTIFICATIVA

Terapias de reposição celular são uma grande promessa para a medicina regenerativa, principalmente as relacionadas a doenças ou traumas do sistema nervoso. Muitos estudos têm reportado de modo positivo a utilização de CT na recuperação funcional de animais com lesões medulares (ANTONIC *et al.*, 2013). As lesões medulares são na sua maioria de origem traumática, resultando em comprometimento da homeostase física e emocional do paciente (MEYER *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, os avanços na compreensão da biologia de CTM adultas têm contribuído para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o reparo e regeneração tecidual (KOLF; CHO; TUAN, 2007). CTM isoladas da medula óssea são as mais utilizadas em modelos experimentais de doenças ou traumas neurológicos devido às evidências de sua capacidade de diferenciação em neurônios e células gliais e de secreção de fatores neurotróficos (PITTENGER *et al.*, 1999). No entanto, a capacidade limitada de expansão das CTM da medula óssea, o seu potencial de diferenciação neural reduzido, além do procedimento de coleta invasivo (CHINNICI *et al.*, 2013) têm comprometido a sua utilização.

Nesse panorama, as CTMD representam uma importante fonte para uso em terapias celulares, uma vez que apresentam plasticidade fenotípica, além de constituírem uma fonte autóloga acessível e abundante. Entretanto, a implementação de tecnologias com propósitos terapêuticos requer o desenvolvimento de metodologias de cultivo e propagação das CTMD, além de estudo aprofundado da sua multipotencialidade (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Diante destas perspectivas e desafios, o presente trabalho busca avaliar o potencial neural da CTMD *in vitro*, utilizando diferentes protocolos de cultivo e diferenciação neural; e *in vivo* em modelo animal de trauma medular.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o potencial neural das CTM dermais (CTMD) humanas, e *in vivo* em modelo de lesão medular em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, em cultura de células, o potencial de diferenciação das CTMD através da expressão de marcadores celulares de pluripotência, marcadores mesenquimais, marcadores neurais precoces, e marcadores neuronais e de células gliais.

- Avaliar o potencial de recuperação funcional das CTMD em modelo de lesão medular traumática de ratos, utilizando a análise da atividade locomotora, através da Escala de Basso, Beatle e Bresnahan (Escala BBB).

- Avaliar o potencial de diferenciação neural das CTMD em modelo de lesão medular traumática de ratos, através da análise de parâmetros histológicos.

- Avaliar o efeito da combinação dos fatores de crescimento EGF e FGF2 em estimular o potencial neural das CTMD.

- Estimular o potencial neuronal das CTMD utilizando diversas condições de cultivo.

3. METODOLOGIA

3.1 CULTURA DE CTMD HUMANAS

As amostras de pele humana foram obtidas em colaboração com o Ilha Hospital Maternidade (Florianópolis, SC). Pacientes do sexo feminino, com idade entre 50 e 70 anos, submetidos a cirurgias de *lifting* facial (ritidoplastias) doaram os fragmentos da pele de descarte, após apresentação e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tendo recebido certificado de aprovação (certificado N° 1921) do Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (Anexo 2). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular (LACERT-UFSC), onde foram processadas em ambiente estéril.

Para o isolamento das CTMD, os fragmentos de pele foram cortados em pequenos pedaços e incubados com 12,5 U/mL de dispase (BD) durante 15 horas, a 4°C. Após este período, a epiderme e a hipoderme foram removidas do tecido com o auxílio de pinça e tesoura, e a derme foi incubada em solução tripsina /EDTA a 0,25%/ 0,02% (Invitrogen) durante 45 minutos a 37°C. Após o bloqueio da reação enzimática, a suspensão de células foi filtrada em malha com poro de 70µm (*Cell Strainer* BD) para remoção dos fragmentos de tecido não dissociados e centrifugada durante 7 minutos a 1.200 rpm. As células foram ressuspensas em meio padrão consistindo de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-F12, Invitrogen), suplementado com penicilina/estreptomicina (PS, 1U/µg, Gibco) e 15% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab). As células foram então plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm² e mantidas a 37°C, 5% CO² e 95% de umidade. O meio de cultivo foi renovado a cada 4 dias e as células não aderentes eram descartadas. Assim que se formavam uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência, as células eram descoladas da garrafa de cultura, utilizando-se tripsina/EDTA a 0,05%/0,02% (Invitrogen). Cada subcultivo celular correspondeu a uma nova passagem e neste estudo foram utilizadas células entre as passagens 3 (P3) e 12 (P12). Os ensaios *in vitro* foram realizados em três experimentos

independentes (cada experimento foi realizado com fragmentos de pele de pacientes distintos).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMD HUMANAS

As CTMD humanas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia de contraste de fase (Olympus CK40), por ensaios de imunofenotipagem e de diferenciação para fenótipos adipogênico e osteogênico descritos a seguir.

3.2.1 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As CTMD foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS acrescido de 10% de SBF a uma concentração de 10^5 células/100 μ L. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos específicos (Tabela 2), durante 1 hora a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS acrescido de 10% de SBF, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 100 μ L da mesma solução e posteriormente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience). Para detecção da fluorescência inespecífica (células negativas), foram utilizados controles isotípicos específicos, constituídos por imunoglobulinas do mesmo isotipo e fluorocromo dos anticorpos utilizados. Os dados foram gerados pelo programa FACS Diva 6.0® e analisados pelo programa Flowing. Como controle dos marcadores da linhagem hematopoiética foram utilizados leucócitos isolados de sangue periférico, os quais abrangem uma população de células CD34 e CD45 positivas.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo

Anticorpo	Imunoglobulina	Fluorocromo
Anti-CD105 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina-cianina (PE-Cy5)
Anti-CD90 (BD)	IgG1 de camundongo	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
Anti-CD73 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina (PE)
Anti-CD45 (BD)	IgG1 de camundongo	FITC
Anti-CD34 (BD)	IgG1 de camundongo	PE-Cy5
Isotipo (BD) 1	IgG1 de camundongo	PE-Cy5
Isotipo (BD) 2	IgG1 de camundongo	FITC
Isotipo (BD) 3	IgG1 de camundongo	PE

3.2.2 Ensaios de Diferenciação Celular

Para os ensaios de diferenciação celular foram usadas CTMD entre P3 e P7, cultivadas em placas de 24 poços (Corning) até confluência aproximada de 80%. O meio de cultivo foi removido e substituído por meio de indução adipogênica ou osteogênica. Como controle foi utilizado o meio DMEM-F12 acrescido de PS e 10% de SBF. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias durante 30 dias. As culturas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂.

3.2.2.1 Diferenciação Adipogênica

A diferenciação adipogênica foi avaliada pela presença de células adipocíticas na cultura após cultivo em meio indutor adipogênico composto de DMEM suplementado com 10% SBF, 10^{-8} M de dexametasona (Sigma), 2,5 μ g/mL de insulina (Sigma), 100 μ M de indometacina (Sigma) e 0,5mM de 3-isobutil-metilxantina (Sigma).

O fenótipo adipogênico foi confirmado pela presença de gotículas lipídicas intracelulares após coloração com vermelho de Sudan 5B lipídico (*Oil Red O*) (Sigma). As células foram mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca do meio a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma) durante 30 minutos e coradas com solução *Oil Red O* por 5 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram então lavados com PBS e as células observadas em microscopia de campo claro (Olympus IX 71).

3.2.2.2 Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi avaliada pela presença de células com características de osteócitos na cultura após cultivo em meio indutor osteogênico composto de DMEM acrescido de antibióticos (1U/ μ g PS) (Gibco), SBF a 10%, 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma), 3,15mg/mL de β -glicerolfosfato (Sigma) e 10^{-8} M de dexametasona (Sigma). Após 30 dias, o meio indutor foi retirado, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com o solução de Vermelho de alizarina (Sigma) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e analisados em microscopia de campo claro para visualização de matriz extracelular calcificada corada em vermelho.

3.3 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL

Para diferenciação em fenótipos neurais, as CTMD (P3 e P7) foram mantidas em diferentes condições de cultivo, como descrito abaixo:

Condição 1 (Fig. 3): Meio indutivo neural, consistindo de meio neurobasal (Invitrogen) suplementado com B27 (Invitrogen), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF, 10 ng.mL⁻¹, Sigma), ácido

ascórbico (200 μM), fator de crescimento de nervo (NGF, 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma), e cAMP (0.1 mM, Sigma), conforme descrito em Liu *et al.* (2012). As culturas foram mantidas por 7 dias, com o meio sendo renovado a cada 3 dias. Após o período de indução, as culturas foram fixadas e imunomarcadas (Tabela 3).

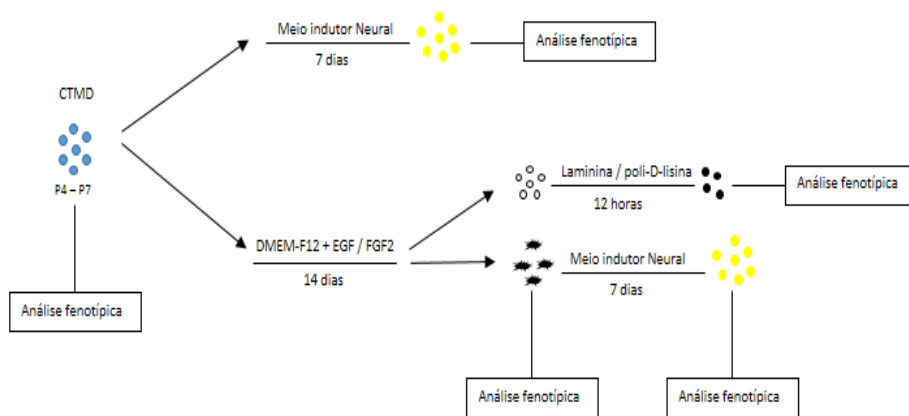
Condição 2 (Fig. 3): As CTMD (P3 e P7) foram semeadas em placas de 24 poços (Corning), a uma densidade de 2000 células por poço, e cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com FGF2 (40 ng/ml) e EGF (20 ng/ml) para isolamento e manutenção de células precursoras neurais. O meio de cultivo foi renovado a cada 4 dias, e as células foram mantidas a 37°C, 5% CO_2 e 95% de umidade durante 14 dias. Após este período, observamos duas populações de células morfologicamente distintas, uma formando esferas em suspensão e outra de células aderentes. Foram analisados o tamanho e o número das esferas formadas por poço, em microscópio de contraste de fase (Olympus CK40), seguido de análise pelo programa *Desktop Ruler* (AVPSoft, Berlin, Germany). Para análise fenotípica, as esferas foram cultivadas em placa contendo laminina e poli-D-lisina e mantidas em meio DMEM-F12 suplementado com EGF e FGF2 durante 12 horas para adesão ao substrato. Posteriormente, as esferas foram fixadas e submetidas à análise de imunofluorescência, conforme descrito abaixo.

As células aderentes obtidas a partir deste protocolo foram fixadas após os 14 dias de cultivo e caracterizadas fenotipicamente, conforme painel de marcadores descritos na tabela 3.

Condição 3 (Fig. 3): As CTMD aderentes cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com EGF e FGF2 por 14 dias conforme descrito acima, foram subsequentemente cultivadas em meio indutivo neural (descrito na condição 1) por mais 7 dias, com o meio sendo renovado a cada 3 dias. Após o período, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, conforme descrito abaixo.

A figura 3 esquematiza a metodologia de diferenciação neural empregada neste trabalho.

Figura 3. Representação esquemática da metodologia de diferenciação neural aplicada neste estudo.



3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para as análises de expressão de marcadores fenotípicos, as culturas foram fixadas em paraformaldeído a 4% (30 minutos), lavadas em PBS e solução de Tween 20 a 0,05%, permeabilizadas com solução Triton X-100 a 0,5% (20 minutos), e incubadas com 5% de SFB (1 hora) para bloqueio de sítios inespecíficos. As culturas foram então incubadas com anticorpos primários (Tabela 3) por 1 hora a temperatura ambiente e a seguir com anticorpos secundários (Tabela 4) também por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 1 minuto com o corante fluorescente DAPI para marcação do DNA nuclear. As marcações foram observadas e analisadas sob microscópio Olympus IX71.

Foram analisados 20 diferentes campos de cada condição experimental, em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas. As proporções da expressão dos marcadores específicos para cada fenótipo foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais, nas diferentes condições de culturas analisadas.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados na análise de Imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Estágio de diferenciação
Anti- CNPase (IgG1 camundongo monoclonal)	Sigma	1:500	Glial
Anti-NSE (IgG2b camundongo monoclonal)	Abcam	1:100	Neuronal
Anti FoxD3 (IgG coelho policlonal)	Abcam	1:100	Neural precoce / CN
Anti GAP43 (IgG coelho policlonal)	Abcam	1:200	Neuronal
Anti GFAP (IgG coelho policlonal)	Sigma	1:200	Glial
Anti map2 (IgG1 camundongo monoclonal)	Abcam	1:500	Neuronal
Anti Mash1 (IgG coelho policlonal)	Abcam	1:200	Neuronal precoce
Anti Nanog (IgG coelho policlonal)	Abcam	1:100	Pluripotência
Anti Nestina 10c2 (IgG camundongo monoclonal)	Santa Cruz	1:100	Neural precoce / CN
Anti Neurofilamento (IgG coelho policlonal)	Sigma	1:200	Neuronal
Anti Oct4 (Ig coelho policlonal)	Millipore	1:100	Pluripotência
Anti p75NTR (IgG coelho policlonal)	Millipore	1:100	Neural precoce / CN
Anti P zero (IgG coelho policlonal)	Santa Cruz	1:100	Glial
Anti Sox2 (IgG2b camundongo monoclonal)	Millipore	1:100	Pluripotência
Anti α -SMA (IgG2a camundongo monoclonal)	Sigma	1:800	Mesenquimal
Anti β -tubulina III (IgG1 camundongo monoclonal)	Promega	1:1000	Neuronal

Tabela 4. Anticorpos secundários utilizados na análise de Imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Diluição
Anti IgG camundongo – conjugado a Alexa 488®	Invitrogen	1:500
Anti IgG coelho – conjugado a Alexa488®	Invitrogen	1:500
Anti IgG camundongo – conjugado a Alexa 594®	Invitrogen	1:500
Anti IgG coelho – conjugado a Alexa 594®	Invitrogen	1:500

3.5 LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA

Os experimentos de lesão medular traumática foram realizados em colaboração com o Laboratório de Peptídeos (Departamento de Farmacologia, Centro de Ciência Biológicas, UFSC). Para isso, foram utilizados ratos *Wistar* machos (10 semanas de idade e peso entre 270-280 g), fornecidos pelo Biotério Central/UFSC e mantidos durante os experimentos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. Os experimentos seguiram as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (*Publication No.* 85-23, revisado em 1996). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Animais (CEUA) da UFSC (Anexo 3) com protocolo N° 680.

Os animais foram alojados em grupos de 5 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em estantes ventiladas a uma temperatura controlada (22 ± 2 °C), umidade entre 60 – 80% e ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com água e ração *ad libitum*. Para a indução da lesão medular traumática foi utilizado o modelo experimental previamente descrito por Vanicky e colaboradores (2001) e Andrade e

colaboradores (2011) com modificações. Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (70 e 10 mg/kg, respectivamente, Bayer) pela via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais receberam antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg). Em seguida, foram realizadas assepsia e tricotomia do dorso do animal, administração subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:50000 - Xylestesin®) e incisão de aproximadamente 3 cm na linha média dorsal em sentido rostro-caudal. O tecido gorduroso da região foi removido e os músculos que se inserem no nível das vértebras torácicas 10-12 foram dissecados, seguido pela remoção dos processos espinhosos e fixação da coluna vertebral através de um fórceps.

Para expor a medula espinhal, foi realizado um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) no nível da 11ª vértebra torácica com o auxílio de microscópio e broca cirúrgicos. O orifício permitiu a inserção de um cateter de embolectomia (Fogarty 2F, Lemaitre Catheters), diretamente no espaço epidural do canal medular. O cateter inserido no canal medular foi então deslocado na direção rostral em aproximadamente 1 cm até repousar sobre a medula espinhal ao nível da 10ª vértebra torácica, onde o mesmo foi inflado atingindo um diâmetro pré-calibrado de 3,0 mm e mantido inflado por 1 min.

Após esse período, o cateter foi cuidadosamente removido e então foi realizada a sutura por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados (sham) foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no canal medular. Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente limpo e aquecido até a recuperação anestésica e observados diariamente para investigação de sinais de desconforto ou infecção. Como o procedimento cirúrgico acarreta alterações na contratilidade/relaxamento da bexiga urinária e do esfíncter uretral externo, a bexiga dos animais submetidos à lesão medular foi esvaziada, diariamente, através da compressão manual da região abdominal do animal (método de Crede), até a restauração do reflexo normal de micção (SANTOS-BENITO *et al.*, 2006), o qual ocorre geralmente 15 a 20 dias após a indução da paraplegia. Todos os cuidados pré e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito e colaboradores (2006), as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e do comitê de ética local.

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais de cinco animais cada, conforme descrito adiante:

- Grupo sham: ratos submetidos apenas à lesão medular, não sendo tratados.
- Grupo lesão + veículo: ratos submetidos à lesão medular, sendo tratados posteriormente com veículo (DMEM-F12).
- Grupo lesão + CTMD: ratos submetidos à lesão medular e à terapia com CTMD (concentração 10^4 células).

3.5.1 Preparação e inoculação de CTMD

As CTMD cultivadas em meio padrão em P3 a P7 foram implantadas na medula espinhal de ratos 1 hora após a lesão. Para tal, o volume de 5 μ l contendo uma quantidade aproximada de 10^4 células foi administrado através de um capilar na medula espinhal auxiliado por um aparelho estereotático nas adjacências caudais e rostrais ao sítio da lesão da medula espinhal. Todos os animais foram mantidos em ambiente aquecido até acordarem da anestesia seguindo o protocolo do comitê de ética local.

3.5.2 Parâmetros locomotores após a lesão medular

A atividade locomotora dos animais foi avaliada através da escala desenvolvida por Basso e colaboradores, denominada BBB (BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN, 1995). Esta escala varia de 0 a 21 e os principais escores são: 0 - nenhum movimento dos membros inferiores; 1 - movimentos leves de uma ou duas articulações; 4 - movimentos leves de todas as três articulações; 7 - movimento de extensão de todas as três articulações; 10 - suporta ocasionalmente o peso sobre as patas traseiras; 15 - Passos consistentes apoiados na planta do pé, coordenação consistente entre membro anterior e posterior e apoio do peso nos artelhos inexistente ou ocasional durante a marcha; posição do membro posterior predominantemente paralela ao corpo; 21 - atividade

locomotora normal. A análise foi realizada com o emprego do teste do campo aberto, e filmado a cada 5 dias após o procedimento cirúrgico, por um período de 5 minutos a cada vez, até o momento da eutanásia. Os vídeos adquiridos foram analisados através do programa para avaliação de parâmetros comportamentais ETHOWATCHER (IEB, UFSC).

3.5.3 Estudos Histopatológicos

3.5.3.1 Coleta e processamento das amostras

A análise histológica da medula espinhal foi realizada 60 dias após a indução da lesão medular traumática. Os animais (n=5) foram sacrificados através de perfusão intracardíaca com PBS. Foram coletados segmentos da medula espinhal (T₈-T₁₀) e fixados em paraformaldeído 4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratadas em uma série crescente de álcool (70%, 90% e 100 %) durante 10 minutos em cada, diafanizadas em xilol por 15 minutos. Após, as amostras foram imersas em parafina líquida à 54°C (overnight) para inclusão. Os blocos parafinados foram seccionados (5-7µm) em micrótomo (Leica), e os cortes obtidos posicionados sobre lâminas de vidro silanizadas.

3.5.3.2. Análise imunoistoquímica

A fim de caracterizar a possível diferenciação celular das CTMD humanas inoculadas, segmentos da medula espinhal torácica foram coletados e processados para análise imunoistoquímica.

Para a realização do ensaio imunoistoquímico as amostras seccionadas foram desparafinadas em xilol, reidratadas em uma série crescente de álcool (70, 90, 80 e 100%) e lavadas com água destilada, conforme descrito no 3.7.1. Logo após, a peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto (Vetec) durante 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por calor, através da incubação em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 a 93-96°C, por 45 minutos. Após, o tecido foi

lavado com PBS acrescido de 0,1% de Tween 20 e os sítios inespecíficos bloqueados com solução de PBS acrescido de 5% de SBF, durante 30 minutos. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2), durante 14 horas, em câmara úmida, a 4°C. Após esse período, foram lavadas com solução de PBS acrescido de 0,1% de Tween 20 durante 15 minutos e, incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas novamente com PBS Tween 0,1% (15 minutos) e incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:200, Sigma), durante 30 minutos. A reação foi revelada em solução de 1% de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio por 10 segundos a 5 minutos. A reação foi interrompida com incubação em água destilada durante 5 minutos. Após a revelação, as lâminas histológicas foram cobertas com lamínulas e visualizadas em microscópio Olympus IX71, as imagens foram capturadas com câmera Olympus DP71. Foram analisados 20 diferentes campos, em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas. A proporção da expressão dos marcadores específicos para cada fenótipo foi analisada pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. A significância das diferenças entre as médias dos grupos tratado e controle foi avaliada pelo teste t de Student e ANOVA de uma via seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. Para análise dos resultados comportamentais foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney U. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 4.0®.

4. RESULTADOS

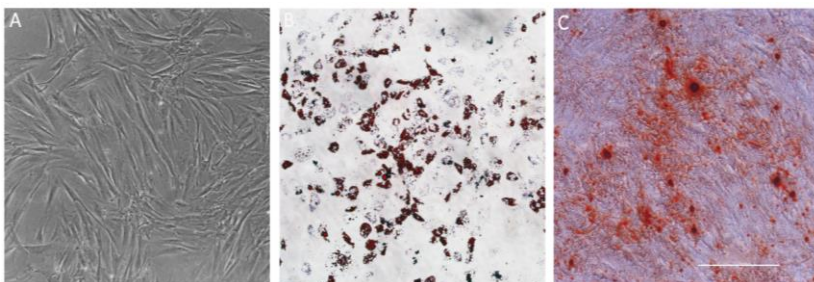
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CTMD HUMANA

As células isoladas e cultivadas a partir de fragmentos de derme facial, foram submetidas à caracterização mesenquimal, segundo os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006), conforme descrito por Jeremias *et al.*, (2014).

Os resultados demonstram que as células isoladas da pele são aderentes ao plástico e apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, com formato fusiforme (Fig. 4A).

As análises de citometria de fluxo demonstraram que cerca de 90% das células em cultura expressaram os marcadores mesenquimais CD73, CD90 e CD105, sendo negativas para os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. Além disso, as células se diferenciaram nos fenótipos adipogênico (Fig. 4B) e osteogênico (Fig. 4C), quando cultivadas em meios indutivos específicos. Em conjunto, estes resultados demonstram que as células isoladas da derme humana apresentam as características de CTM, sendo denominadas neste estudo de CTM dermais (CTMD).

Figura 4. Caracterização das CTMD. (A) Fotomicrografia em contraste de fase evidenciando a morfologia fibroblastóide das CTMD. (B-C) Microscopia de campo claro de CTMD coradas com (B) Vermelho de Sudan evidenciando a diferenciação adipogênica e com (C) Vermelho de Alizarina evidenciando a diferenciação osteogênica. Escala: 200µm.



4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO PADRÃO

Trabalhos anteriores do nosso grupo sugerem que as CTMD apresentam ampla plasticidade fenotípica, uma vez que expressam marcadores de pluripotência, e alguns marcadores característicos de linhagem neural, como β -tubulina III e nestina quando cultivadas em condição padrão (JEREMIAS *et al.*, 2014), indicando que mais estudos são necessários para confirmar a potencialidade neural das CTMD. Desta forma, neste trabalho investigamos mais profundamente o potencial de diferenciação das CTMD, avaliando a expressão de marcadores de pluripotência, bem como marcadores dos diversos estágios da diferenciação neural.

Inicialmente, avaliamos a expressão de fatores de transcrição Sox2, Oct4 e Nanog envolvidos com o estado de pluripotência e identificados em CTM da medula óssea (KURODA *et al.*, 2010). As análises demonstraram que $69,3 \pm 1,4\%$ das CTMD expressam Sox2, $68 \pm 1,5\%$ expressam Oct4, e $76,6 \pm 1,2\%$ expressam Nanog em uma distribuição citoplasmática (Fig. 5A-C).

A seguir, analisamos a expressão da proteína de filamento intermediário Nestina (Fig. 5D) e do receptor de membrana para neurotrofinas, p75NTR (Fig. 5E), presentes em precursores neurais e nas células da CN (NELMS; LABOSKY, 2010, BRESSAN *et al.*, 2014). As análises de imunofluorescência demonstram que $35,6 \pm 2,3\%$ das CTMD cultivadas na condição padrão são positivas para Nestina, e $46 \pm 1,5\%$ para p75NTR.

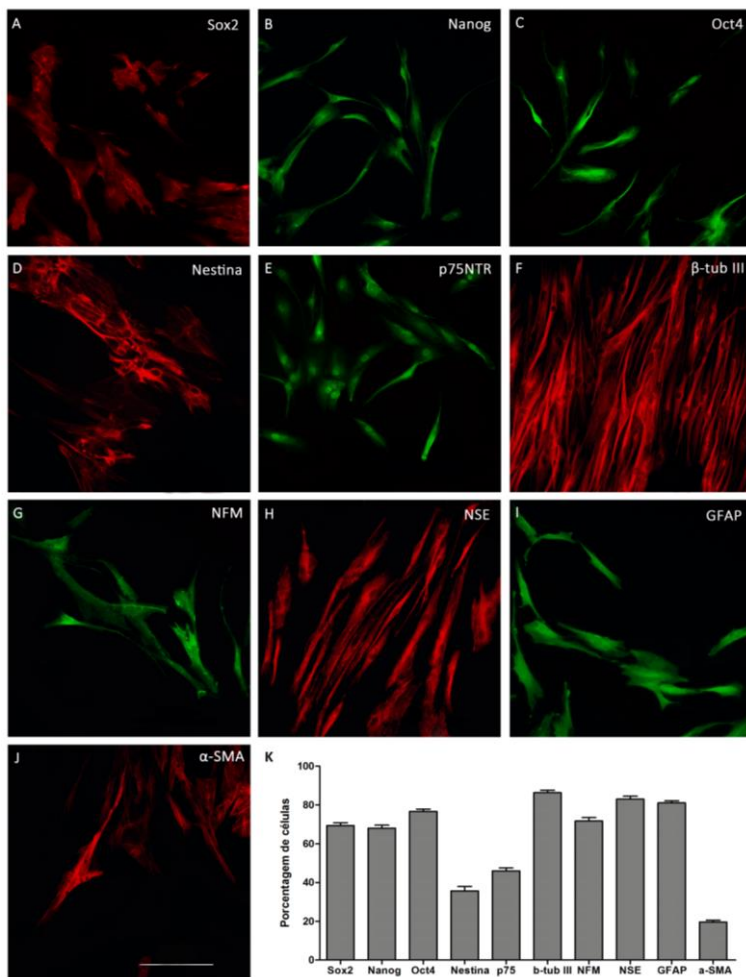
Nestas condições, as CTMD humanas foram negativas para os fatores de transcrição Mash1 e FoxD3, envolvidos na especificação neuronal durante o desenvolvimento embrionário (KIM *et al.*, 2011). Além disso, as CTMD expressaram os marcadores neuronais β -tubulina III ($86,3 \pm 1,2\%$ das células, Fig. 5F), Neurofilamento de cadeia média (NFM, $71,6 \pm 1,8\%$ das células, Fig. 5G), e Enolase específica de neurônio (NSE, $83 \pm 1,5\%$ das células, Fig. 5H). Por outro lado, não foi observada marcação para a Proteína associada à microtúbulos do tipo 2 (MAP2) e nem para a proteína associada ao crescimento axonal 43 (GAP43), características de neurônios maduros.

Avaliamos então a expressão dos marcadores gliais: Proteína zero (p0), marcador de precursor de célula de Schwann (GAJAVELLI *et al.*, 2004), Proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador de astrócito, e 3',5'-nucleotídeo cíclico fosfodiesterase (CNPase), marcador de oligodendrócito. Nossos resultados demonstraram que as CTMD não foram imunorreativas para p0 e CNPase, porém, $81 \pm 1,1\%$ das CTMD expressaram o marcador glial GFAP (Fig. 5I).

A seguir, a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), marcador de músculo liso um fenótipo mesenquimal (NAKAJIMA *et al.*, 1997) foi analisada, sendo detectada em $19,6 \pm 0,8\%$ das células (Fig. 5J).

Em conjunto, os resultados acima sugerem que as CTMD humanas apresentam ampla plasticidade fenotípica quando cultivadas em meio padrão, expressando marcadores de pluripotência, bem como alguns marcadores envolvidos com as linhagens neuronal, glial e mesodermal em vários estágios de diferenciação celular.

Figura 5. Expressão de marcadores de (A-C) pluripotência, (D-I) neurais e (J) mesenquimais pelas CTMD em meio padrão. Fotomicrografia de fluorescência para (A) Sox2, (B) Oct4, (C) Nanog, (D) Nestina, (E) p75NTR, (F) β -tubulina III, (G) NFM, (H) NSE, (I) GFAP e (J) α -SMA. (K) Gráfico representativo das células imunomarcadas. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. Escala: 200 μ m.



4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM MEIO INDUTIVO NEURAL

Os resultados anteriores sugerem que as CTMD humanas quando cultivadas em condição padrão expressam alguns marcadores neuronais e gliais. A seguir, com o intuito de estimular ainda mais o processo de diferenciação neural das CTMD humanas, investigamos a sua capacidade em responder à fatores indutivos neurais.

As CTMD foram então cultivadas em substrato de laminina e poli-D-lisina, na presença de fatores indutores neurais por 7 dias conforme protocolo previamente descrito (LIU *et al.* 2012), e a expressão de marcadores dos diversos estágios da diferenciação neural foi analisada por imunofluorescência.

Ao analisarmos a expressão de marcadores relacionados ao estágio precoce de diferenciação neural (Fig. 6), observamos a presença de Nestina (Fig. 6A) e p75NTR (Fig. 6B) em $39,3 \pm 1,4\%$ e $47 \pm 1,7\%$ das células, respectivamente, sem diferença significativa quando comparado ao meio padrão (Fig. 6D). Porém, Mash1, ausente em meio padrão, foi detectado em cerca de $80 \pm 1,5\%$ das CTMD após cultivo em meio indutivo neural (Fig. 6C, D). Por outro lado, o fator de transcrição FoxD3, não foi detectado.

A seguir, analisamos a expressão de proteínas específicas neuronais (Fig. 7). Nas condições de indução neuronal, β -tubulina III foi detectada em $87,4 \pm 0,9\%$ das CTMD, proporção semelhante ao meio padrão (Fig. 7A, E). A expressão de NFM (Fig. 7B, E) foi observada em $87 \pm 0,5\%$ e NSE (Fig. 7C, E) em $91 \pm 2,3\%$ das CTMD, valores significativamente maiores que na condição padrão, representando aumento de 18% e 8,7%, respectivamente (Fig. 7E). Por outro lado, o marcador MAP2, não encontrado na condição padrão, passou a ser expresso em $33,4 \pm 0,6\%$ das células mantidas em meio indutivo neural (Fig. 7D). É importante destacar que, enquanto que as células imunorreativas para β -tubulina III e NFM mantiveram a morfologia fibroblastóide (Fig. 7A, B), as positivas para NSE e MAP2 apresentaram redução do corpo celular e finos prolongamentos celulares (Fig. 7C, D, setas), numa morfologia semelhante à neuronal.

Figura 6. Expressão de marcadores neurais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural. (A) Fotomicrografia de fluorescência para (A) Nestina, (B) p75NTR e (C) Mash1 (C). (D) Análise quantitativa das células imunomarcadas. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. Escala: 200 μ m.

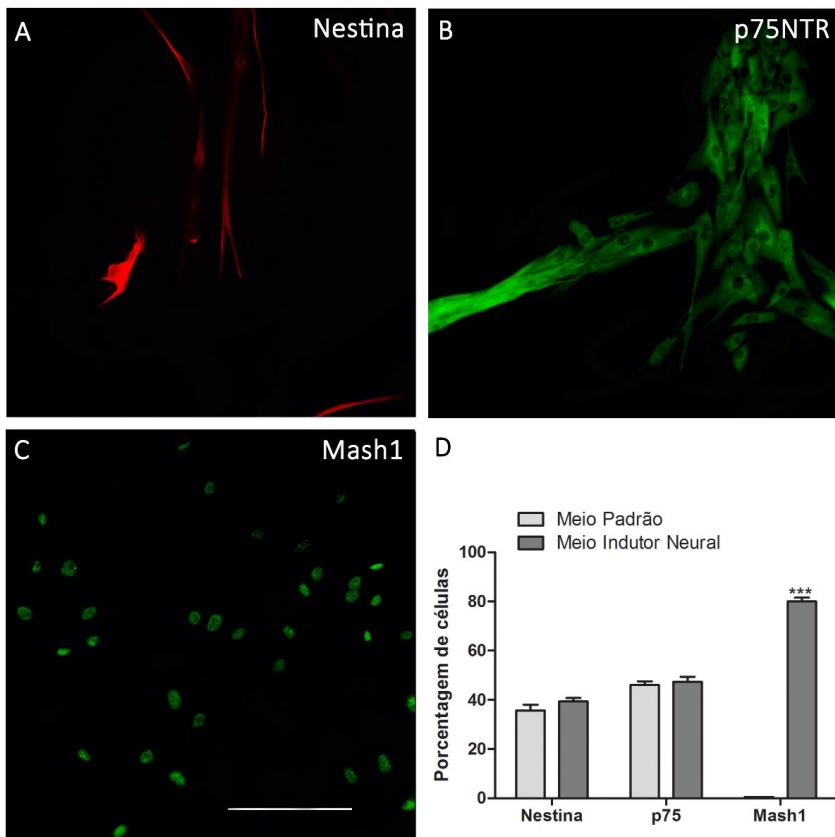
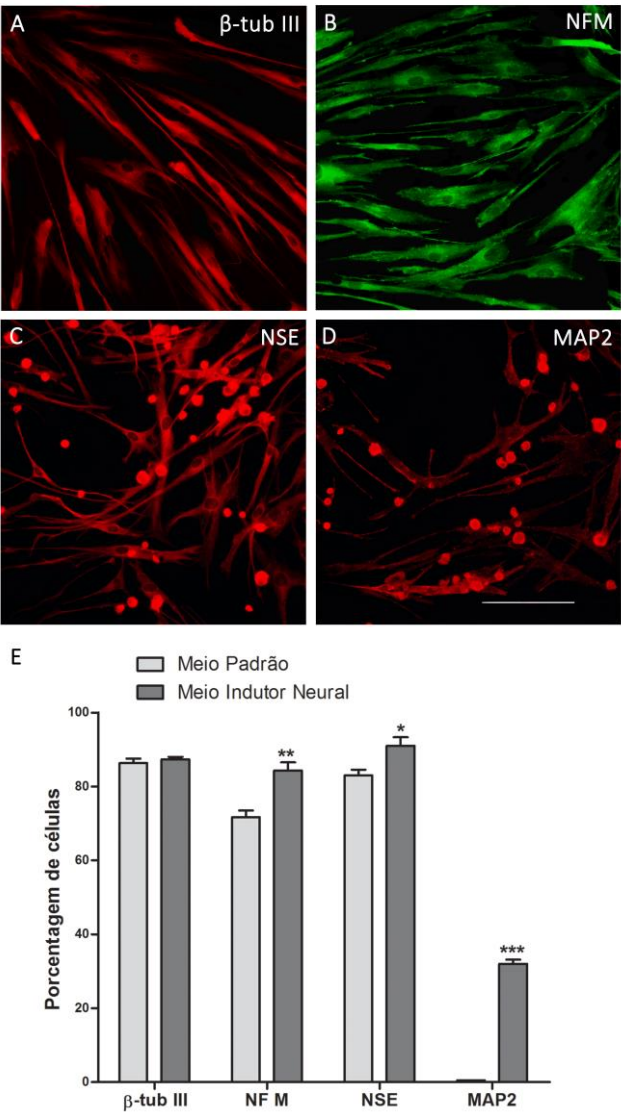
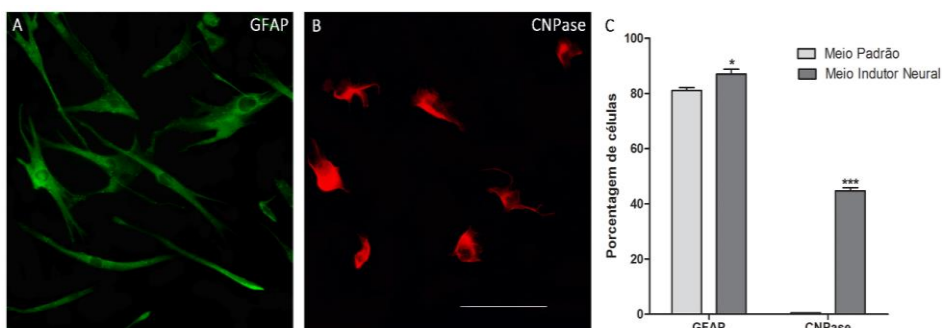


Figura 7. Expressão de marcadores neuronais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural. Fotomicrografia de fluorescência para (A) β -tubulina III, (B) NFM, (C) NSE e (D) MAP2. (E) Análise quantitativa das células imunomarcadas. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. * para $p < 0,05$, ** e para $p < 0,01$ por teste t. Escala: 200 μ m.



Avaliamos então a expressão de marcadores gliais (Fig 8). Observamos que $87 \pm 1,7\%$ das CTMD foram imunorreativas para GFAP, representando um aumento de 7% quando comparado ao meio padrão (Fig. 8A,C). Interessantemente, o marcador CNPase, ausente na condição padrão, passou a ser expresso em $44,6 \pm 1,2\%$ das CTMD após a indução neural (Fig. 8B,C). No entanto, assim como em meio padrão, a proteína p0 não foi expressa nestas condições de indução.

Figura 8. Expressão de marcadores gliais pelas CTMD cultivadas em meio indutivo neural. Fotomicrografia de fluorescência para (A) GFAP e (B) CNPase. (C) Análise quantitativa das células imunomarcadas. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. * para $p < 0,05$ por teste t. Escala: 200 μ m



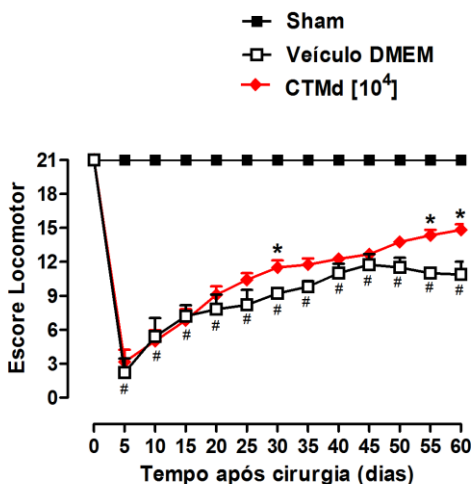
Em conjunto, estes resultados demonstram que as CTMD quando cultivadas em meio indutivo neural passam a expressar o fator de transcrição mash-1, gene mestre da diferenciação neuronal (BERTRAND; CASTRO; GUILLEMOT, 2002), a proteína de citoesqueleto neuronal MAP2 e a proteína glial CNPase. Além disso, há um aumento no número de células que expressam as proteínas neuronais NFM e NSE, que sofreram alterações morfológicas, e das que expressam o marcador astrocitário GFAP. Os resultados sugerem ainda que o potencial de diferenciação neuronal e glial podem ser estimulado *in vitro*.

4.4 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD HUMANAS EM MODELO DE LESÃO MEDULAR

Devido às evidências do potencial neural das CTMD *in vitro*, investigamos o comportamento das CTMD *in vivo*, em um ambiente de injúria, onde uma gama de moléculas e fatores indutores são constantemente liberados. Para avaliar se este microambiente poderia ser propício para que as CTMD apresentem potencial de regeneração funcional, analisamos esse potencial em modelo de lesão medular de ratos.

Utilizamos um modelo de lesão medular induzida por compressão. Os resultados demonstraram que a atividade locomotora dos animais avaliada entre o 5º e o 60º dia após a lesão pela escala BBB melhorou significativamente com a inoculação das CTMD. No 25º dia após o transplante, os animais tratados com as CTMD apresentaram um escore BBB em torno de 11 (animal suporta ocasionalmente o peso sobre as patas traseiras), enquanto que os animais inoculados com veículo (DMEM-F12) apresentaram escore de 7 (Movimento amplo das três articulações do membro posterior) (Fig. 9). Esse resultado foi mais expressivo no 60º dia após a lesão, quando os animais inoculados com as CTMD apresentaram escore em torno de 15 (Passos consistentes apoiados na planta do pé, coordenação consistente entre membro anterior e posterior e apoio do peso nos artelhos inexistente ou ocasional durante a marcha; posição do membro posterior predominantemente paralela ao corpo) quando comparado ao grupo veículo que apresentou escore de 10 (Passos ocasionais apoiados na planta do pé com suporte do peso corpóreo, sem coordenação entre membro anterior e posterior) (Fig. 9).

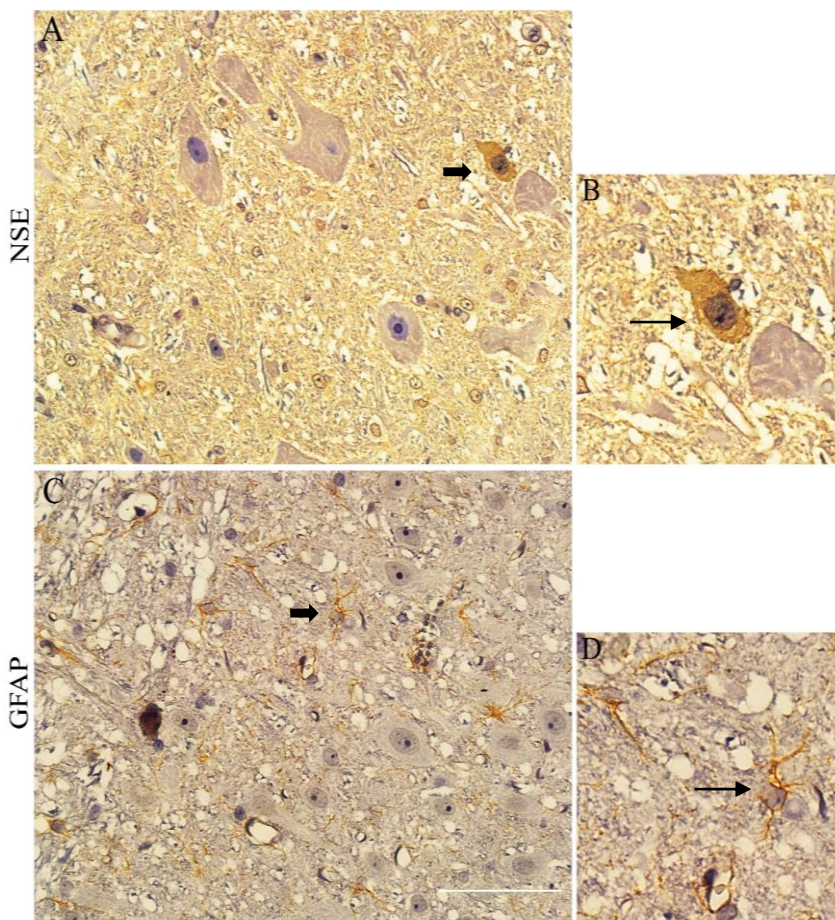
Figura 9. Avaliação locomotora pela escala BBB dos animais submetidos a lesão medular e inoculados com CTMD em relação ao tempo pós-cirurgia. 10^4 CTMD foram inoculadas no local 1 hora após a lesão. A avaliação locomotora foi realizada a cada 5 dias, de acordo com os critérios de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Os valores representam a média \pm S.E.M. de 5 animais para cada grupo. Os símbolos denotam os níveis de significância: # e * $P < 0,05$. * grupo 10^4 células comparado com o grupo veículo e # tratados com veículo em comparação com o grupo sham (Mann-Whitney U).



4.4.1 Análise histológica das CTMD na lesão medular

Para avaliar a presença de CTMD no tecido, foi realizada análise imunoistológica 60 dias após a lesão medular (Fig. 10). Foram utilizados anticorpos anti-GFAP (Sigma) e anti-NSE (Abcam) que reconhecem especificamente epítomos humanos de modo a identificar apenas as células inoculadas que expressassem esses marcadores segundo informações do fabricante. Foram observadas cerca de 2% de células positivas para NSE (Fig. 10 A, B) e 5% positivas para GFAP (Fig. 10C, D) no sítio da inoculação, quando comparado ao número total de células, sugerindo que as CTMD humanas se integraram ao tecido animal e expressaram características gliais e neuronais quando implantadas no microambiente do sistema nervoso central após uma lesão.

Figura 10. Análise imunoistológica das CTMD 60 dias após lesão medular. Corte da medula a nível das vértebras torácicas 8-10. Foram utilizados anticorpos (A) anti- NSE (seta) e (B) anti-GFAP (seta) que reconhecem especificamente epítomos humanos. Escala: 200 um.

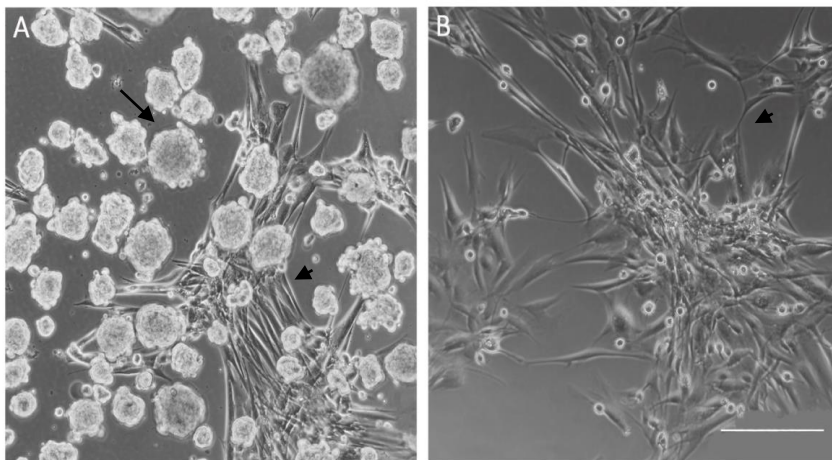


4.5 INDUÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL NEURAL DAS CTMD POR EGF E FGF2

Os resultados acima sugerem que as CTMD apresentam potencial de diferenciação neural uma vez que expressam *in vitro* marcadores neurais precoces na condição padrão, e marcadores neuronais e gliais mais específicos após indução neuronal, além de se integrarem *in vivo* no microambiente do SNC expressando marcadores neuronal e glial. Considerando que: (1) que o processo de diferenciação celular é complexo e progressivo, compreendendo diversas etapas programadas geneticamente (SCOTT, 1997); (2) que as CTMD humanas apresentam potencial neural *in vitro* e *in vivo*; e (3) que o isolamento, cultivo e amplificação de células com características de progenitores neurais a partir das CTMD seria de grande interesse para futuros procedimentos em terapia celular e medicina regenerativa; decidimos avaliar se condições de cultivo usadas para o isolamento, cultivo e amplificação de progenitores neurais poderiam ser mais efetivas para as CTMD. Neste sentido, os fatores de crescimento EGF e FGF2 são amplamente descritos pela literatura por sua capacidade de estimular a proliferação e sobrevivência de progenitores neurais no SNC (COUTU; GALIPEAU, 2011), como indutores da diferenciação neuronal pelas CT embrionárias e CT pluripotentes induzidas (EBERT *et al.*, 2013) e na diferenciação neural das células da CN embrionária (GARCEZ *et al.*, 2009, BITTENCOURT *et al.*, 2013) e do folículo piloso (BRESSAN *et al.*, 2014). Desse modo, investigamos se o cultivo em meio contendo EGF e FGF2 poderia ser efetivo na diferenciação neural das CTMD humanas.

Para isso, as CTMD foram cultivadas em meio definido contendo EGF e FGF2 por 14 dias, conforme descrito previamente (BRESSAN *et al.*, 2014). Nestas condições, duas populações celulares morfológicamente distintas foram observadas: uma composta por células não aderentes formando esferas em suspensão (seta em Fig. 11A), e outra composta por células aderentes agrupadas, com morfologia triangular ou fusiforme (cabeça de seta em Fig. 11A, B).

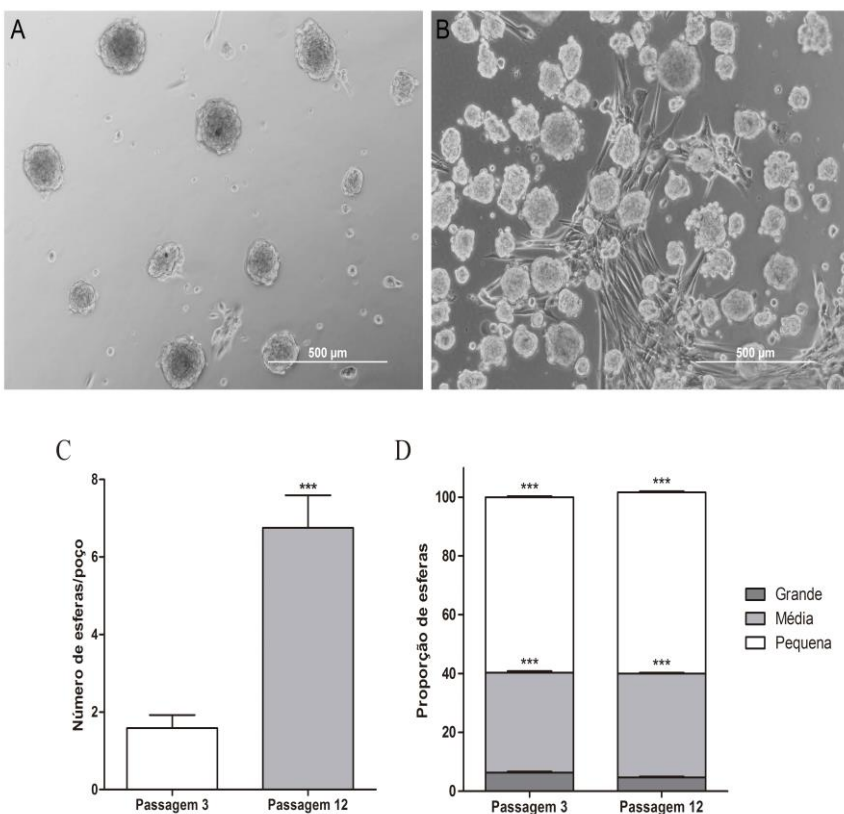
Figura 11. Fotomicrografia de contraste de fase de culturas de CTMD em meio contendo EGF e FGF2. CTMD(A) Células não aderentes formando esferas em suspensão (seta). (A-B) Células aderentes, menores triangulares ou fusiformes (cabeças de seta). Escala: 200µm



4.5.1 Estudo das esferas de CTMD em meio contendo EGF e FGF2

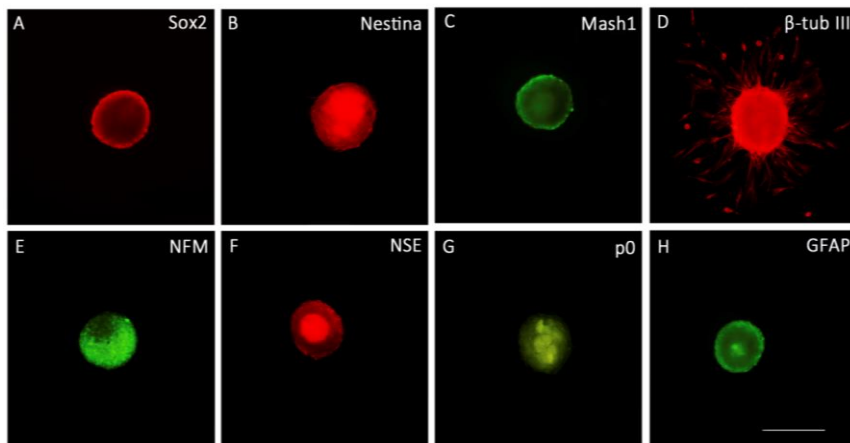
Inicialmente avaliamos a capacidade das CTMD de P3 e de P12 em formar de esferas quando submetidas a meio contendo EGF e FGF2 (Fig. 12). Os resultados revelaram um número de esferas por poço 3 vezes maior nas CTMD de P12 em relação às de P3 (Fig. 12A). No entanto, quando classificadas em relação ao tamanho, resultados semelhantes foram obtidos em ambas as passagens: 60% das esferas eram de tamanho pequeno (diâmetro de até 100µm), 35% médio (diâmetro entre 100 e 200µm) e 5% grandes (diâmetro superior a 200µm) (Fig. 12B).

Figura 12. Avaliação das esferas de CTMD cultivadas em meio contendo EGF e FGF2. Fotomicrografias representativas de (A) esferas em passagem 3 e (B) esferas em passagem 12. (C) Número de esferas por poço de placas de 24 poços. *** $P < 0,001$ pelo Teste t. (D) Número de esferas pequenas (até 100 μm de diâmetro), médias (entre 100 e 200 μm de diâmetro) e grandes (maiores que 200 μm de diâmetro) por poço de placas de 24 poços. *** $P < 0,001$ pelo Teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste Bonferroni - pequena vs. média vs. grande.



A seguir, realizamos análise fenotípica das esferas. Para tanto, após o procedimento de obtenção (14 dias de cultivo em meio contendo EGF e FGF2), as esferas foram cultivadas por mais 12 horas neste mesmo meio sobre substrato de laminina e poli-D-lisina. Nestas condições as esferas aderem fracamente ao substrato com uma discreta migração de células (Fig. 13). Observamos, restrito às esferas, a expressão dos marcadores de pluripotência (Sox2), neurais precoces (Nestina e Mash1), de neurônios (NFM e NSE) e de células gliais (p0, GFAP) (Fig 13A-C, E-H). Por outro lado, o marcador neuronal β -tubulina III foi detectado tanto nas esferas quanto nas células com morfologia fusiforme ou triangular que migraram para a placa de cultura (Fig. 13D). Todas as esferas foram negativas para o marcador músculo liso (α -SMA).

Figura 13. Análise fenotípica molecular das esferas de CTMD cultivadas em meio contendo EGF e FGF2. Imunofluorescência para (A) Sox2, (B) Nestina, (C) Mash1, (D) β -tubulina III, (E) NFM, (F) NSE, (G) p0 e (H) GFAP. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. Escala: 200 μ m.



4.5.2 Estudo das CTMD aderentes em meio contendo FGF e FGF2

Realizamos então a análise fenotípica das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2, avaliando a expressão dos marcadores de pluripotência (Fig. 14), neurais precoces (Fig. 15), de neurônios (Fig. 16), de células gliais (Fig. 17) e de músculo liso (Fig. 18). Os resultados revelaram que grande parte dessas células CTMD eram positivas para Sox2 (Fig. 14A), Oct4 (Fig. 14B) e Nanog (Fig. 14C) ($78,3 \pm 2,6\%$, $82,3 \pm 1,4\%$ e $90,3 \pm 0,8\%$, respectivamente) representando aumentos de 13%, 21% e 18%, respectivamente, em relação ao meio padrão (Fig. 14D).

De modo similar, os marcadores neurais precoces Nestina (Fig. 15A) e p75NTR (Fig. 15B), foram observados em $60,6 \pm 0,8\%$ e $41,6 \pm 2,0\%$, respectivamente, das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 representando aumento de 54% e 70%, respectivamente, em relação ao meio padrão (Fig. 15E). Por outro lado, a expressão dos fatores de transcrição Mash1 (Fig. 15C) e FoxD3 (Fig. 15D) (ausentes das CTMD em meio padrão) foi observada em $76,7 \pm 2,0\%$ e $72,6 \pm 2,0\%$, respectivamente, das CTMD aderentes (Fig. 15 E) nestas condições.

Figura 14. Análise da expressão de marcadores de pluripotência pelas CTMD aderentes cultivadas em meio contendo EGF e FGF2. Imunofluorescência para (A) Sox2, (B) Oct4 e (C) Nanog. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com EGF e FGF2. (D) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão (D). Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ por Teste t. Escala: 200 μ m.

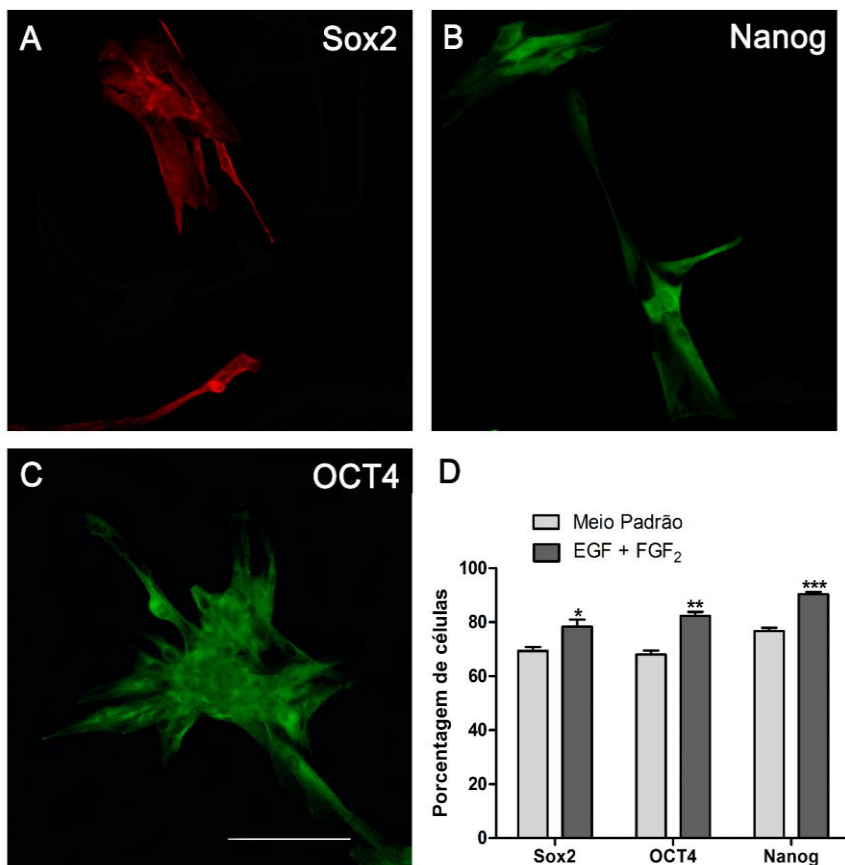
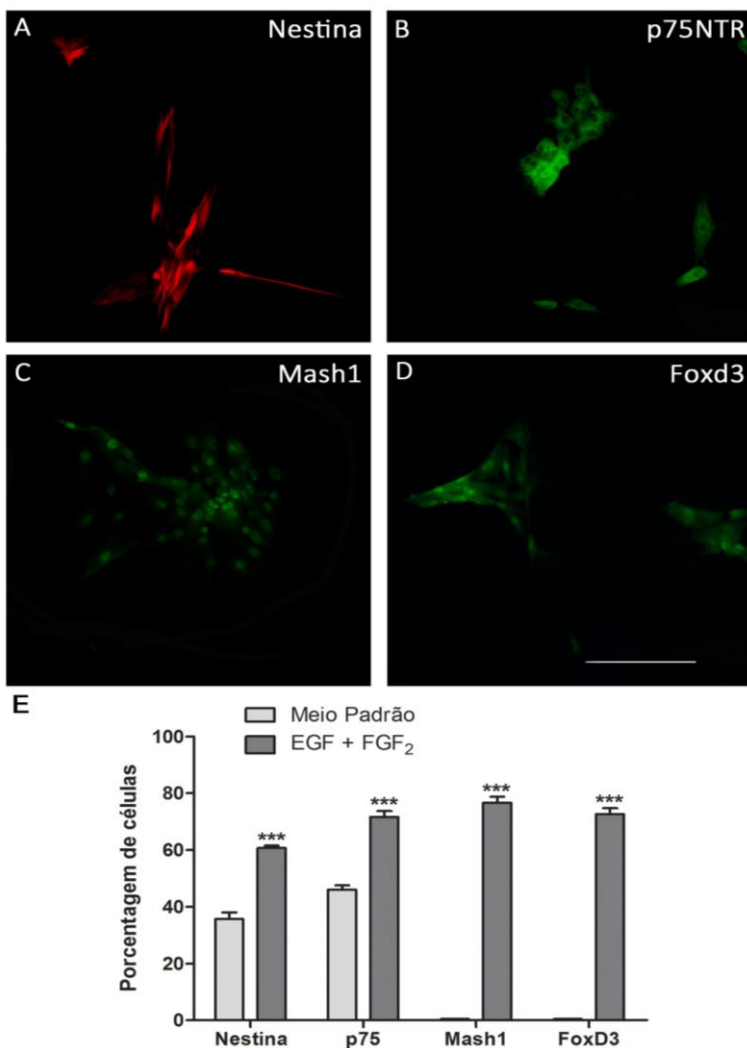
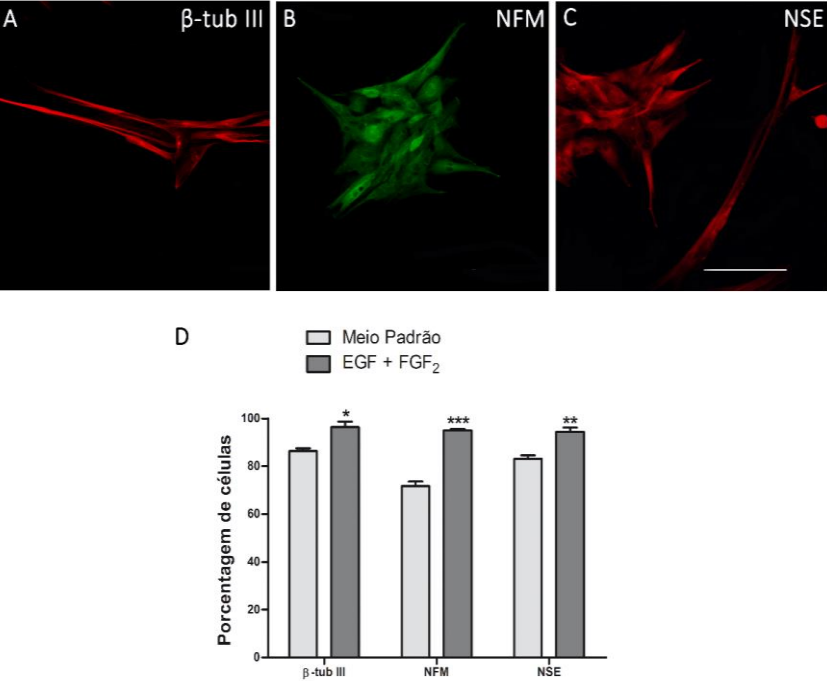


Figura 15. Análise da expressão de marcadores de precursores neurais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2. Imunofluorescência para (A) Nestina, (B) p75NTR, (C) Mash1 e (D) FoxD3. As células foram cultivadas como descrito na Figura 11. (E) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$ por Teste t. Escala: 200 μ m.



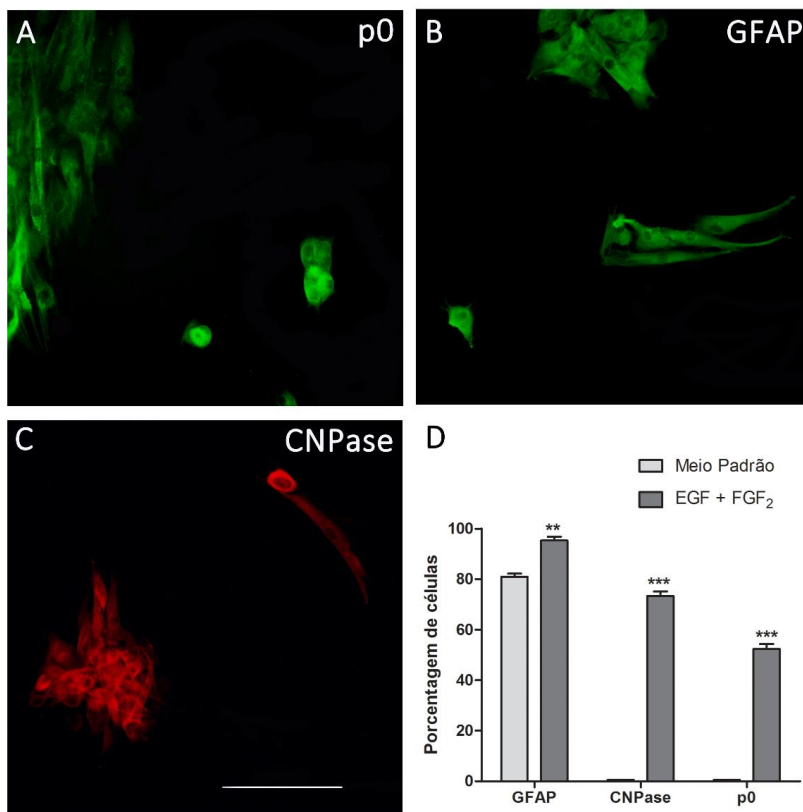
Nossos experimentos revelaram ainda que $96,3 \pm 2,3\%$, $95 \pm 0,57\%$, $94,3 \pm 1,7\%$ das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 foram imunorreativas para os marcadores neuronais β -tubulina III, NFM e NSE, respectivamente, representando aumento de 11%, 33%, e 13%, respectivamente, em relação ao meio padrão (Fig. 16A-D).

Figura 16. Análise da expressão de marcadores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2. Imunofluorescência para (A) β -tubulina III, (B) NFM e (C) NSE. (D) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão). Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ **, $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ por Teste t. Escala: 200 μ m.



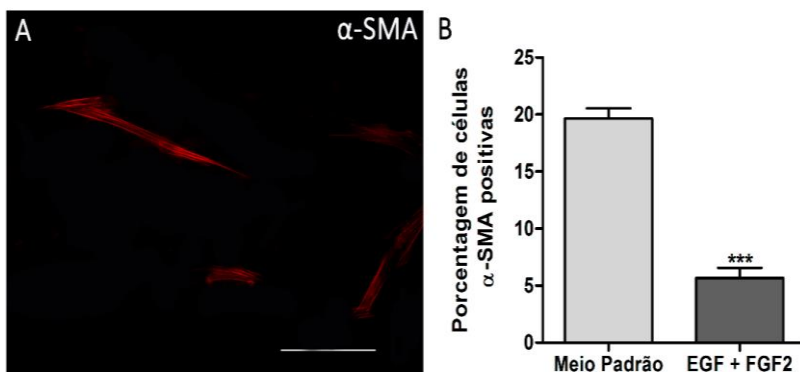
Analizamos ainda a expressão dos marcadores de células gliais p0 (célula de Schwann, Fig. 17A), GFAP (astrócitos, Fig. 17B) e CNPase (oligodendrócitos, Fig. 17C). p0, ausente nas CTMD em meio padrão, foi observado em $52,3 \pm 2\%$ das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2, GFAP em $95,3 \pm 1,4\%$, representando aumento de 17% comparado ao meio padrão, e CNPase, também ausente em meio padrão, em $73,3 \pm 1,7\%$ destas (Fig. 17D).

Figura 17. Análise da expressão de marcadores gliais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2. Imunofluorescência para (A) p0, (B) GFAP (B) e (C) CNPase. (D) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ por Teste t. Escala: 200 μ m.



Por fim, analisamos a expressão do marcador α - actina de músculo liso (Fig. 18A). Os resultados demonstraram que $5,6 \pm 0,8\%$ das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 expressam α -SMA, representando uma redução de 73% quando comparado ao meio padrão (Fig. 18B).

Figura 18. Análise da expressão do marcador muscular liso (α SMA) pelas das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2. (A) Fotomicrografia de fluorescência e (B) análise quantitativa. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. *** P < 0,001 por Teste t. Escala: 200 μ m.



Em conjunto, estes resultados demonstraram que as CTMD quando cultivadas em meio contendo EGF e FGF2 formam esferas e também crescem aderidas. Nestas condições há um aumento na proporção de CTMD aderentes positivas para os marcadores de pluripotência, neurais precoces, de neurônios e células gliais, acompanhado de redução na proporção do marcador mesenquimal, em relação ao meio padrão. Desse modo, os resultados sugerem que EGF e FGF2 possa estar direcionando as CTMD, para um estado similar ao de progenitor neural.

4.6 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DAS CTMD

Avaliamos a seguir, se o cultivo das CTMD aderentes em meio indutor neural após o cultivo em EGF e FGF2 descrito acima poderia promover ou direcionar de modo mais efetivo a diferenciação neuronal. Para tanto, as CTMD foram mantidas em EGF e FGF2 durante 14 dias, e a seguir no meio indutivo neuronal.

As análises revelaram que $39,3 \pm 0,6\%$ das células nessas condições foram imunorreativas para Nestina (Fig.19A, D) e $47,3 \pm 1,7\%$ para p75NTR (Fig.19B, D), representando redução de 35% e 34%, respectivamente, em relação em meio com EGF e FGF2, porém sem diferença quando comparado ao meio padrão. Aproximadamente 80% das células foram positivas para marcador Mash1 (não expresso no meio padrão) similar ao meio contendo EGF e FGF2 (Fig. 19C, D). FoxD3 não foi observado nestas condições (Fig. 19D).

Os resultados revelaram ainda que 95%, 89% e 86% das CTMD aderentes expressaram os marcadores neuronais β -tubulina III (Fig. 20A, E), NFM (Fig. 20B, E) e NSE (Fig. 20C, E), respectivamente nessas condições de cultivo (meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neuronal). Os valores de β -tubulina III e NFM foram similares aos do meio contendo EGF e FGF2. Enquanto a proporção de células imunorreativas para NSE foi semelhante ao meio padrão, sendo reduzida quando comparado com o meio contendo EGF e FGF2. Além disso, observamos que as CTMD positivas para estes marcadores tornaram-se mais alongadas ou triangulares, ou ainda com morfologia bipolar, quando comparadas ao meio com EGF e FGF2 (Fig.20A-C). É importante destacar que a proteína envolvida com crescimento axonal GAP43, não detectada no meio padrão e em meio contendo EGF e FGF2 foi observada em $7,6 \pm 0,3\%$ das CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutivo neural (Fig. 20D e E).

Figura 19. Análise da expressão dos marcadores de progenitores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural. Imunofluorescência para (A) Nestina, (B) p75NTR e (C) Mash1. (D) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão (Fig. 2D e E) e meio contendo EGF e FGF2 (Fig. 12). Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$ por Teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste Bonferroni. Escala: 200 μ m.

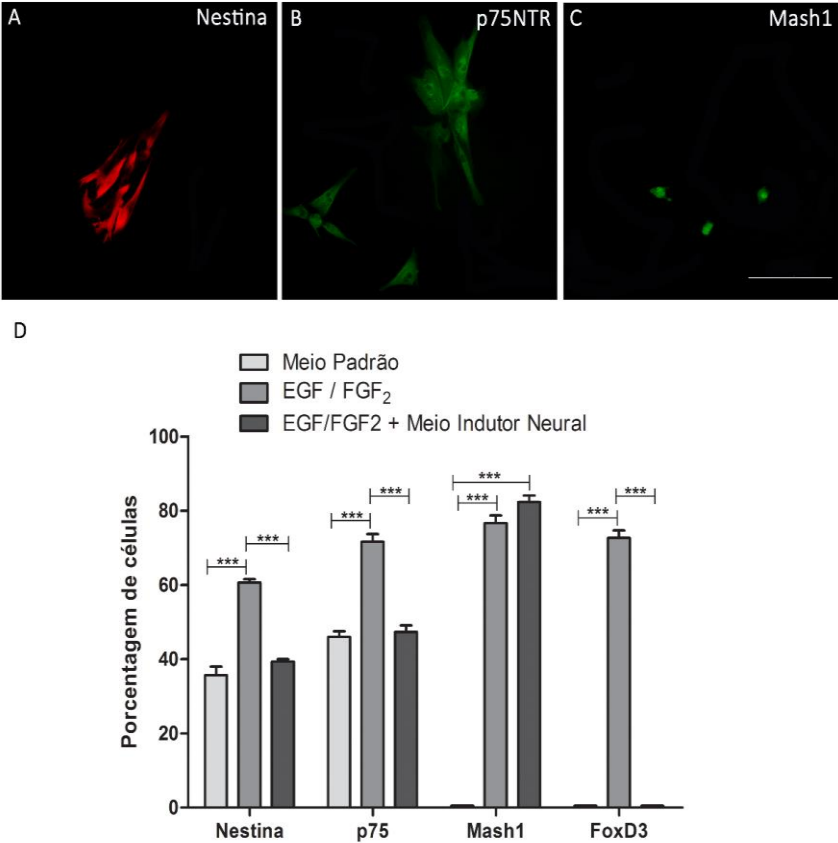
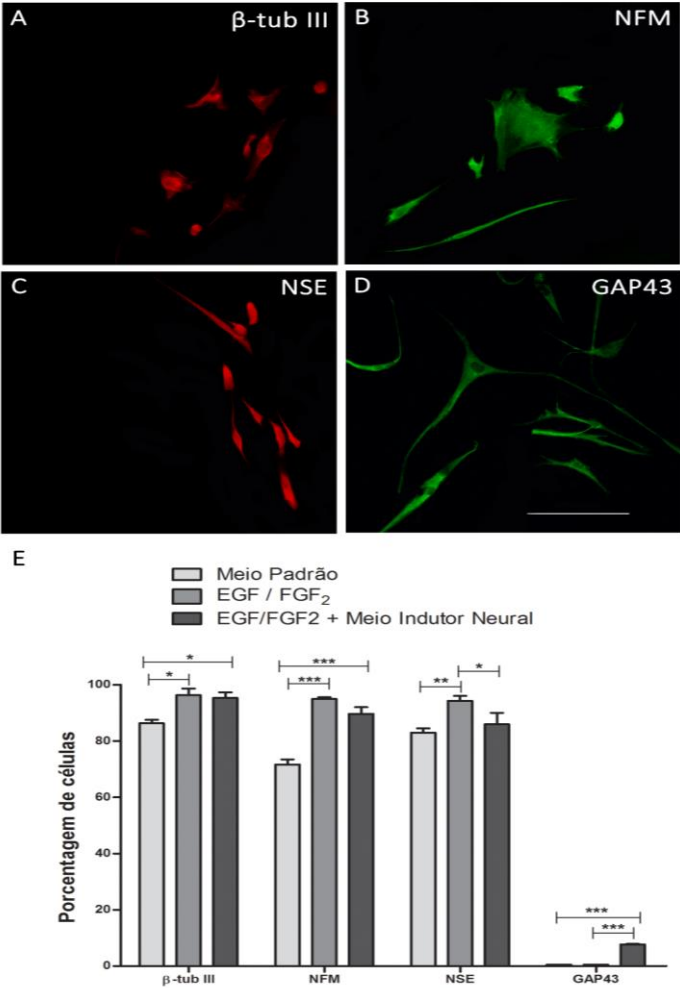
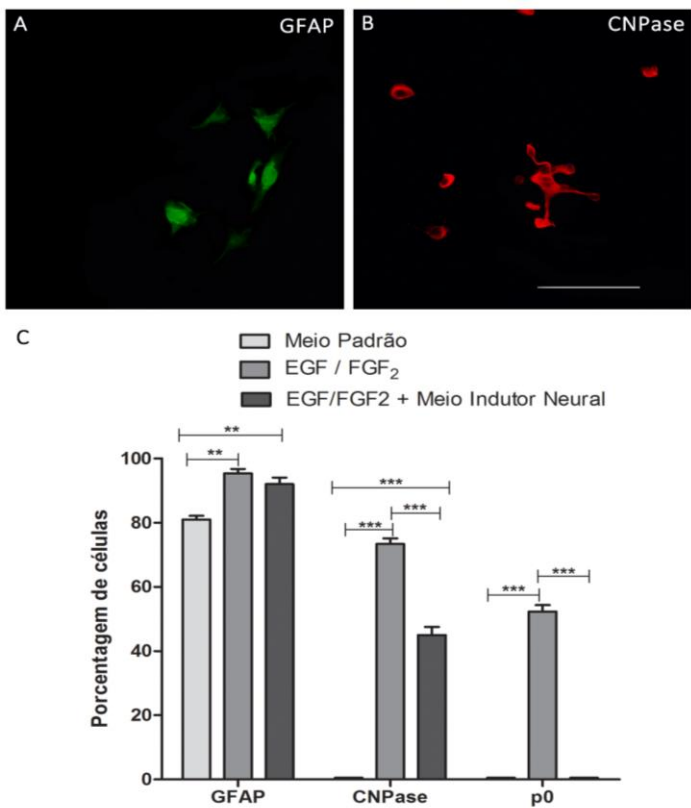


Figura 20. Análise da expressão dos marcadores neuronais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural. Imunofluorescência para (A) β -tubulina III, (B) NFM, (C) NSE e (D) GAP43. (E) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão (Fig. 2F-H) e meio contendo EGF e FGF (Fig. 13). Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ **, $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ por Teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste Bonferroni. Escala: 200 μ m



Por fim, analisamos a expressão de marcadores gliais pelas CTMD aderentes (Fig. 21). A proteína p0 não foi observado nestas condições. No entanto, $92,2 \pm 2\%$ das CTMD expressaram GFAP, valores significativamente maiores que em meio padrão, mas semelhantes às células mantidas em meio com EGF e FGF2 (Fig. 21A, C). Além disso, $45 \pm 2\%$ das CTMD foram imunorreativas para CNPase, uma redução de 38% em comparação ao meio com EGF e FGF2 (Fig. 21B, C).

Figura 21. Análise da expressão dos marcadores gliais pelas CTMD aderentes em meio contendo EGF e FGF2 seguido de meio indutor neural. Imunofluorescência para (A) GFAP (A) e (B) CNPase. (C) Análise quantitativa dos marcadores comparado ao meio padrão (Fig. 2i) e meio contendo EGF e FGF (Fig.14). Os valores representam as médias \pm S.E.M de 3 experimentos independentes. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ por Teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste Bonferroni. Escala: 200 μ m

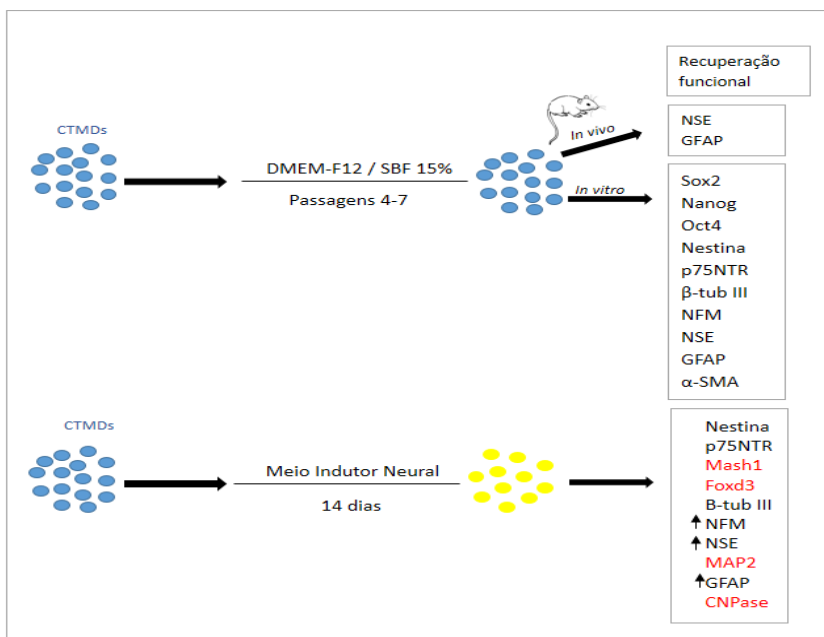


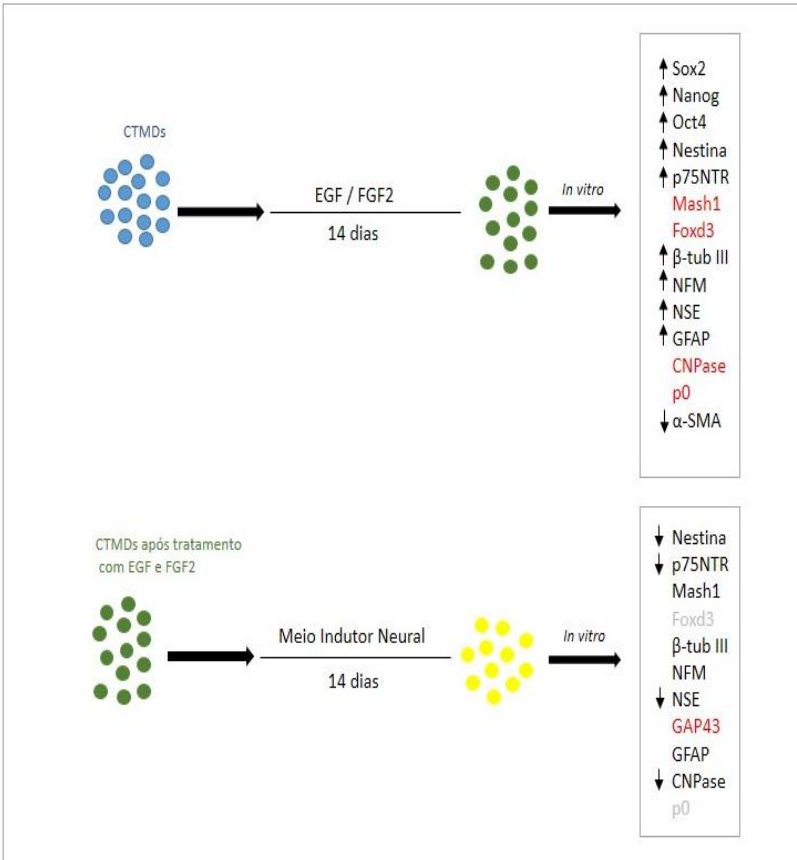
A figura 22, a seguir, sumariza os principais resultados obtidos ao longo do presente trabalho. Embora um protocolo de diferenciação mais eficiente se mostre necessário, nossos resultados evidenciaram que as CTMD possuem potencialidade para fenótipos neurais *in vitro* e *in vivo*. Quando cultivadas em meio indutor neural, aumentam a expressão de marcadores neuronais e gliais. Em meio suplementado com EGF e FGF2, há um aumento na proporção de células similares às progenitoras e de células da linhagem neuronal e glial, às expensas do fenótipo mesenquimal. O cultivo em meio suplementado com EGF e FGF2 seguido de meio indutivo neural aumenta o potencial neurogênico das CTMD em detrimento do glial. Entretanto, em nenhuma das condições analisadas, observamos a morfologia clássica neuronal, sugerindo que as CTMD necessitam de outras etapas de indução para que o processo de diferenciação neuronal possa se tornar efetivo.

Figura 22. Representação esquemática dos resultados obtidos neste trabalho.

CTMD expressaram marcadores envolvidos com a linhagem neural, *in vivo* e *in vitro*. Painel 1: CTMD cultivadas em meio padrão (DMEM-F12 / SBF 15%), passagens 4-7. Analisadas fenotipicamente *in vitro* e *in vivo*. Painel 2: CTMD cultivadas em meio indutor neural durante 7 dias em placa contendo laminina e poli-D-lisina. Painel 3: CTMD cultivadas em meio suplementado com EGF e FGF2, durante 14 dias. Painel 4: CTMD aderentes cultivadas durante 14 dias em meio suplementado com EGF e FGF2, e posteriormente cultivadas por 7 dias em meio indutor neural. Em vermelho: marcador que passou a ser expresso; cinza: marcador que deixou de ser expresso na condição experimental indicada.

↑ Aumento ou ↓ diminuição na proporção de células positivas para o marcador.





5. DISCUSSÃO

As CT adultas representam uma fonte promissora de células para a medicina regenerativa e engenharia tecidual. Populações com características de CTM têm sido recentemente isoladas da pele e mais precisamente do tecido dérmico (VACULIK *et al.*, 2012), abrindo novas possibilidades para as pesquisas com CT.

Neste sentido, as células derivadas da derme descritas neste trabalho apresentam as características mínimas de CTM estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, como adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, expressão dos marcadores de superfície mesenquimais (CD73, CD90 e CD105), ausência dos marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45), potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais (adipogênico e osteogênico) e portanto podem ser consideradas como células-tronco mesenquimais da derme (CTMD).

Além disso, uma proporção das CTMD foi positiva (aproximadamente 19%) para α -SMA, marcador de células de músculo liso, um fenótipo mesenquimal. Entretanto, α -SMA não é um marcador exclusivo das células de músculo liso, sendo expresso em CTM com potencial multi-linhagem (LIU *et al.*, 2013), além de ser um dos marcadores de pericitos (CRISAN *et al.*, 2008; ALLIOT *et al.*, 1999). Dessa forma, alguns estudos tem sugerido que as CTM possuam origem perivascular (CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Evidências dessa hipótese são a capacidade de diferenciação das CTM em fenótipos mesenquimais, expressão de marcadores e morfologia similares a de pericitos (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Assim, o perfil fenotípico das CTMD parece corroborar com a hipótese de que estas células tenham um nicho perivascular (JEREMIAS *et al.*, 2014).

Em nossos experimentos, observamos ainda a expressão dos marcadores de pluripotência Oct4, Nanog e Sox2 pelas CTMD. Esses fatores de transcrição mantém a pluripotencialidade de CT embrionárias e foram descritos em CTM de diversos tecidos como medula óssea, tecido adiposo, coração e derme (KURODA *et al.*, 2010; RIEKSTINA; CAKSTINA; PARFEJEVS, 2009). Além disso, estudos têm relatado a localização destes marcadores no citoplasma, e não no núcleo, onde

exercem função como fator transcripcional (IZADPANAH et al., 2006; RIEKSTINA et al., 2009; ZUK et al., 2001). Neste trabalho, observamos que as proteínas Oct-4, Nanog e Sox-2 estão localizadas no citoplasma das CTMD. A existência de várias isoformas destes genes pode ser a explicação para as diferentes localizações destes fatores (ATLASI et al., 2008). Pouco se conhece sobre o papel funcional destes marcadores de pluripotência em CT adultas. Entretanto, tem sido demonstrado que a redução da expressão de Oct4 em CTM da medula óssea humana induz alterações na morfologia celular e diminui as taxas de crescimento. Além disso, um mecanismo regulador semelhante para esses fatores foi proposto tanto para CTM quanto para CT embrionárias (GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007). Nossos dados sugerem uma relação dos níveis de expressão de Oct4, Nanog e Sox2 com o estado de diferenciação das CTM adultas, da mesma forma que ocorre em CT embrionárias (CHICKARMANE *et al.*, 2006), o que demonstra que esses fatores podem estar relacionados com a manutenção da multipotencialidade de CTM adultas (TSAI *et al.*, 2012; FERRO *et al.*, 2012).

As CT adultas representam uma fonte promissora de células para a medicina regenerativa e engenharia tecidual. Populações com características de CTM têm sido recentemente isoladas da pele e mais precisamente do tecido dérmico (VACULIK *et al.*, 2012), abrindo novas possibilidades para as pesquisas com CT.

Neste sentido, as células derivadas da derme descritas neste trabalho apresentam as características mínimas de CTM estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, como adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, expressão dos marcadores de superfície mesenquimais (CD73, CD90 e CD105), ausência dos marcadores hematopoieticos (CD34 e CD45), potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais (adipogênico e osteogênico) e portanto podem ser consideradas como células-tronco mesenquimais da derme (CTMD).

Além disso, uma proporção das CTMD foi positiva (aproximadamente 19%) para α -SMA, marcador de células de músculo liso, um fenótipo mesenquimal. Entretanto, α -SMA não é um marcador exclusivo das células de músculo liso, sendo expresso em CTM com potencial multi-linhagem (LIU *et al.*, 2013), além de ser um dos marcadores de pericitos (CRISAN *et al.*, 2008; ALLIOT *et al.*, 1999). Dessa forma, alguns estudos tem sugerido que as CTM possuam origem

perivascular (CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Evidências dessa hipótese são a capacidade de diferenciação das CTM em fenótipos mesenquimais, expressão de marcadores e morfologia similares a de pericitos (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Assim, o perfil fenotípico das CTMD parece corroborar com a hipótese de que estas células tenham um nicho perivascular (JEREMIAS *et al.*, 2014).

Em nossos experimentos, observamos ainda a expressão dos marcadores de pluripotência Oct4, Nanog e Sox2 pelas CTMD. Esses fatores de transcrição mantém a pluripotencialidade de CT embrionárias e foram descritos em CTM de diversos tecidos como medula óssea, tecido adiposo, coração e derme (KURODA *et al.*, 2010; RIEKSTINA; CAKSTINA; PARFEJEVS, 2009). Pouco se conhece sobre o papel funcional destes marcadores de pluripotência em CT adultas. Trabalhos tem relacionado esses fatores à manutenção da multipotencialidade de CTM adultas, da mesma forma que ocorre em CT embrionárias (TSAI *et al.*, 2012; FERRO *et al.*, 2012; CHICKARMANE *et al.*, 2006). Ademais, tem sido demonstrado que a redução da expressão de Oct4 em CTM da medula óssea humana induz alterações na morfologia celular e diminui as taxas de crescimento. Entretanto, estudos têm relatado a localização destes marcadores no citoplasma, e não no núcleo, onde exercem função como fator transcripcional (IZADPANAH *et al.*, 2006; RIEKSTINA *et al.*, 2009; ZUK *et al.*, 2001). A existência de várias isoformas destes genes pode ser a explicação para as diferentes localizações destes fatores (ATLASI *et al.*, 2008). Neste trabalho, observamos que as proteínas Oct-4, Nanog e Sox-2 estão localizadas no citoplasma das CTMD, sugerindo que a expressão dessas proteínas pode não estar associada à pluripotência das CTMD.

5.1. AS CTMD APRESENTAM POTENCIAL NEURAL EM CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que as CTMD expressam os marcadores associados com a linhagem neuronal Nestina e β -tubulina III, sem a morfologia neuronal típica

(JEREMIAS *et al.*, 2014), o que pode sugerir um potencial neural. No presente trabalho investigamos mais profundamente a potencialidade neural das CTMD. Avaliamos inicialmente a expressão de marcadores envolvidos em diversos estágios da diferenciação neural, como Nestina, p75NTR, Mash1 e FoxD3. Observamos que uma subpopulação de CTMD expressam o receptor p75NTR e a proteína Nestin, indicando uma possível potencialidade neural destas células, e corroborando com trabalhos em roedores que sugerem que CT multipotentes derivadas da derme expressam marcadores de crista neural como Pax3, Snail, Slug, Nestina e p75NTR (TOMA *et al.*, 2005; ZABIEROWSKI *et al.*, 2011).

Apesar de p75NTR estar presente no sistema nervoso (LEVIMONTALCINI, 1987), sendo expresso nas CT da crista neural (CRANE; TRAINOR, 2006), foi encontrado também em tecidos não neurais, como em células mesenquimais dos testículos, e durante o desenvolvimento dos rins e dentes, (CAMPAGNOLO *et al.*, 2001; SARIOLA *et al.*, 1991; BYERS *et al.*, 1990). Mikami e colaboradores (2011) demonstraram que p75NTR atua como um regulador chave na manutenção do estado indiferenciado de CTM, o que poderia explicar a ausência da morfologia neuronal nas CTMD positivas para p75NTR observada em nosso trabalho. Além disso, os fatores de transcrição envolvidos com linhagens neurais específicas, Mash1, pertencente à família básica hélice-alça-hélice (b-HLH), que promove a indução neuronal em células progenitoras (BERTRAND; CASTRO; GUILLEMOT, 2002), e o fator de transcrição FoxD3, requerido para a manutenção e comprometimento neuronal de células da crista neural (MUNDELL; LABOSKY, 2011; NELMS; LABOSKY, 2010) não foram detectados nas CTMD em nossos experimentos.

Confirmando a plasticidade neural das CTMD na condição padrão, verificamos a expressão dos marcadores neuronais: β -tubulina III, NFM e NSE, embora as células não apresentassem a morfologia típica neuronal. Por outro lado, os marcadores de neurônios GAP-43 e MAP2 não foram encontrados, sugerindo que nestas condições a potencialidade neural é expressa de modo limitado. Esses resultados são coerentes com dados da literatura que demonstraram a expressão de β -tubulina III, NFM e NSE em CTM da medula óssea de rato na ausência de fator indutivo (DENG *et al.*, 2006).

Além disso, têm sido demonstrado que as CTM expressam naturalmente (sem indução) marcadores gliais como GFAP e S100 β

(FOUDAH *et al.*, 2012; NEUHUBER *et al.*, 2011). Esses achados são coerentes com nossos resultados em que observamos a expressão do marcador de astrócitos GFAP em aproximadamente 80% das células. Por outro lado, a expressão de proteínas envolvidas com a produção de mielina como CNPase e p0, não foi observada. Esses resultados sugerem que as CTMD apresentam potencial glial, possivelmente relacionado à diferenciação astrocitária, mas não oligodendrocitária e de célula de Schwann, ou que precisa de estímulos adicionais para expressá-lo.

Em resumo, o perfil fenotípico das CTMD observado neste estudo sugere ampla plasticidade fenotípica. Estas células expressam marcadores de pluripotência, bem como marcadores envolvidos com as linhagens neuronal, glial e mesodermal. Embora as CTMD não tenham adquirido morfologia típica e expressão de marcadores neuronais e gliais específicos, como MAP2, GAP43, e CNPase, elas expressam marcadores da linhagem neural indiferenciada, como Nestina, p75NTR, e os marcadores pan-neuronal β -tubulina III, NFM e NSE. É possível que a exposição a um microambiente apropriado e/ou a indução com fatores apropriados possa estimular o processo de diferenciação neuronal.

5.2. AS CTMD APRESENTAM POTENCIAL NEURAL *IN VIVO* EM MODELO ANIMAL DE TRAUMA MEDULAR

Diante do exposto, e com base em nossos resultados anteriormente discutidos, analisamos o comportamento das CTMD *in vivo*, no microambiente do sistema nervoso central, em modelo animal de trauma medular. Trabalho anterior do laboratório havia demonstrado que estas células apresentam plasticidade neural *in vitro*, além de potencial para tratamento de lesões cutâneas em ensaios pré-clínicos promovendo reparo tecidual através de uma maior vascularização, re-epitelização, depósito de matriz extracelular e recrutamento de macrófagos e neutrófilos na lesão quando associadas à substitutos dérmicos (Jeremias *et al.*, 2014).

Investigamos o possível efeito do transplante de CTMD em ratos após trauma medular. Os animais apresentaram melhora funcional parcial após o 25º dia, com ápice no 50º dia do transplante com CTMD, apresentando escore locomotor 15 (em uma escala entre 0 e 21). A análise histológica do tecido no 60º dia após o transplante revelou células humanas no local da lesão positivas para NSE e GFAP. Como os

anticorpos utilizados para esses marcadores eram específicos para antígenos humanos segundo instruções do fabricante, os resultados indicam que as CTMD humanas inoculadas se integraram no microambiente da medula espinhal e adquiriram características neuronais e gliais possivelmente se diferenciando para esses fenótipos. Esses resultados são coerentes com o trabalho de Kopen e colaboradores (1999) que demonstrou que CTM podem adotar fenótipos neurais quando expostas ao microambiente do cérebro, após sua implantação em encéfalos de camundongos neonatos. Experimentos adicionais precisam ser realizados para confirmar esses achados. Em conjunto resultados funcionais e histopatológicos sugerem que as CTMD humanas apresentam potencial de regeneração em lesão de medula espinha.

A melhora locomotora apresentada pelos animais sugere que as CTMD podem estar protegendo o tecido lesionado e facilitando sua reparação independentemente da sua capacidade em gerar células diferenciadas. De fato, foi sugerido que os efeitos regenerativos das CTM no tecido lesionado ocorra principalmente pela secreção de fatores parácrinos que estimulem células progenitoras residentes do que pela transdiferenciação e substituição das células lesadas ou mortas. Evidências sugerem que a maioria dos efeitos promovidos pelas CTM residem em seu secretoma (RIBEIRO et al., 2011; PHINNEY; PROCKOP, 2007)

Neste sentido, foi demonstrado que fatores secretados por CTM modulam a inflamação após lesão renal aguda (SEMEDO *et al.*, 2009), elevam o reparo cardíaco e a contratilidade em miocárdio isquêmico (NGUYEN *et al.*, 2010), além de induzirem efeitos imunomodulatórios imediatos em pacientes com esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (KARUSSIS *et al.*, 2010). Li e colaboradores (2010) relataram que o transplante de CTM inibiu a atividade exagerada da astroglia e proporcionou um ambiente favorável para progenitores endógenos em cérebro isquêmico em *Macaca fascicularis*. Assim, as propriedades imunomodulatórias das CTMD pode ser um dos fatores que contribuiu para a recuperação funcional observada nos animais xenotransplantados em nosso estudo.

As CTM secretam ainda, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma variedade de fatores neurotróficos, como IGF-1, BDNF, o VEGF, o GM-CSF, FGF2, e TGF- β , com papel proeminente na inibição de cicatrizes, controle da apoptose, modulação da resposta imune, da neurogênese e da

angiogênese (UCCELLI *et al.*, 2011; CAPLAN e DENNIS, 2006). Além disso, as CTM expressam uma variedade de moléculas de adesão e de proteínas da matriz extracelular que podem promover a recuperação neural *in vivo* (HARDY; MALTMAN; PRZYBORSKI, 2008; CRIGLER *et al.*, 2006; TREMAIN *et al.*, 2001).

Foi demonstrado ainda que o tratamento da medula espinal pós-lesão com CTM de medula óssea de rato resultou em significativa redução da expressão de caspase-3, sugerindo um efeito anti-apoptótico (DASARI *et al.*, 2007).

Portanto, a recuperação motora observada em nossos experimentos após o transplante de CTMD pode ter ocorrido por uma combinação de efeitos como transdiferenciação direta, imunomodulação e produção de moléculas que influenciam as CT residentes, a sobrevivência neuronal e neuritogênese, melhorando assim o microambiente da lesão. Assim, a terapia baseada em CTMD pode ser uma nova abordagem para a regeneração tecidual após lesão medular.

5.3. O COMPROMETIMENTO NEURAL DA CTMD PODE SER ESTIMULADO *IN VITRO*

Trabalhos da literatura demonstraram que CTM podem adquirir morfologia e expressar marcadores neuronais e gliais após estímulo com cAMP, neurotrofinas, ácido retinóico, NGF, FGFb, forskolina e fator de crescimento glial (NEIRINCKX *et al.* 2013; SANCHEZ-RAMOS *et al.* 2000; TOHILL *et al.* 2004; QIAN & SALTZMAN 2004; SAFFORD *et al.* 2004). No entanto, quando transferimos as CTMD humanas do meio padrão diretamente ao meio indutivo neural contendo B27, BDNF, ácido ascórbico, NGF e cAMP, não observamos diferenças em relação à morfologia e à proporção de células positivas para Nestina e p75NTR. Porém, 80% delas passaram a expressar Mash1, fator de transcrição mestre envolvido no comprometimento neuronal (KIM *et al.*, 2011). Genes pro-neurais codificam um grupo de proteínas bHLH que atuam como reguladores transcricionais com papel central na diferenciação neuronal (KAGEYAMA *et al.*, 2005). A expressão desses genes pró-neurais é necessária para promover a geração de diferentes neurônios a partir de células progenitoras indiferenciadas (CARDOZO; GÓMEZ; ARGIBAY, 2012). Ito e colaboradores (2005) sugeriram que as

neurotrofinas estimulam a diferenciação neural controlando a expressão de vários fatores de transcrição da família bHLH, o que corrobora com nosso resultado de que as CTMD são capazes de responder aos fatores neurotróficos do meio indutivo neuronal ao expressar Mash1. Além disso, o marcador dendrítico MAP2, não expresso na condição padrão e uma proporção significativamente maior de CTMD expressando NFM e NSE foram observadas após cultivo nesse meio indutivo neural. Estes resultados sugerem que a potencialidade neural das CTMD é estimulada pelo meio indutivo neural, no entanto não de modo suficiente para direcionar o destino celular, e que outros fatores podem ser necessários para promover a diferenciação neuronal de modo mais efetivo.

5.3.1. EGF e FGF2 estimulam o comprometimento neural das CTMD *in vitro*

Os fatores de crescimento EGF e FGF2 são amplamente utilizados para amplificação de progenitores neurais do sistema nervoso central, de precursores neurais derivados de CT embrionárias e de CT de pluripotência induzida e em CT da crista neural (BITTENCOURT *et al.*, 2013; GARCEZ *et al.*, 2009; POLLARD *et al.*, 2006; CONTI *et al.*, 2005; REYNOLDS *et al.*, 1992).

Recentemente demonstramos que CT epidermais da crista neural (EPI-NCSC) de vibrissas de camundongos, caracterizadas pela expressão de genes de crista neural (Nestina, p75NTR, Pax3, Slug, Snail, Sox10 e Twist), podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* em meio contendo EGF e FGF2 (BRESSAN *et al.*, 2014). Foi observado aumento na proliferação e direcionamento das células a um estado de progenitor neuronal às expensas das características gliais e de músculo liso, evidenciado por aumento na taxa de incorporação de BrdU e aquisição de morfologia semelhante à neuronal, aliada a expressão de proteínas neurais. Além disso, o cultivo das EPI-NCSC nesse meio de cultivo aumentou a sua resposta ao meio indutivo neuronal evidenciado pela indução da expressão de GAP43 e aumento na expressão de Mash1 (BRESSAN *et al.*, 2014) (Anexo 4).

Além das EPI-NCSC, as SKP (*Skin derived progenitors* ou progenitores derivados da pele), descritas por Toma e colaboradores (2005), foram isoladas da pele humana ou animal após da indução com

EGF e FGF2. Estas crescem em esferas com propriedades semelhantes às neuroesferas formadas pelas CT neurais (HUNT; JAHODA; CHANDRAN, 2009).

Desse modo, levantamos a hipótese de que o cultivo em meio contendo EGF e FGF2 poderia conduzir as CTMD a um estágio de progenitor neural. Os resultados revelaram duas diferentes populações celulares nessas condições de cultivo, uma composta por células aderentes agrupadas com morfologia triangular ou fusiforme, e outra constituída por células que crescem em esferas em suspensão.

As esferas foram obtidas a partir de monocamadas de CTMD de passagens baixa (P3) e alta (P12). O número de esferas obtido a partir de CTMD de P12 foi significativamente maior do que o de P3, apesar do tamanho das esferas ser equivalente. Em ambas as passagens a proporção de esferas menores é 2 vezes maior que a das médias e aproximadamente 10 vezes maior que a das grandes. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que sugerem que células mais indiferenciadas tendem a formar esferas, e que quanto maior o número de passagens, maior a probabilidade de obter uma cultura mais homogênea e enriquecida em CT derivadas da pele humana (HUANG *et al.*, 2010).

Os resultados revelaram ainda que as esferas obtidas a partir das CTMD cultivadas sobre substrato de laminina e poli-D-lisina e mantidas em meio com EGF e FGF2, apresentaram discreta ou nenhuma migração celular, e apresentaram marcação para Sox2, Nestina, Mash1, p0, GFAP, NFM e NSE. A marcação de β -tubulina III foi detectada tanto na esfera quanto nas células que migraram a partir desta apresentando morfologia bipolar e triangular. O marcador de músculo liso, α -SMA não foi expresso. Estes resultados corroboram com dados da literatura, onde SKP obtidas a partir de monocamadas de células dermais são morfológica e funcionalmente semelhantes às SKP tradicionais obtidas pela dissecação e dissociação da derme (HILL *et al.*, 2012), e expressam Nestina, p75NTR, β -tubulina III e NFM (TOMA *et al.*, 2005). Nossos achados sugerem ainda que a obtenção de SKP a partir de monocamadas de CTMD pode ser um o protocolo alternativo e eficiente, uma vez que apresentam perfil fenotípico semelhante às SKP tradicionais.

Embora seja um método muito utilizado para obtenção de células com potencial neural, muitos pesquisadores consideram que as culturas em esfera apresentam limitações (PASTRANA *et al.*, 2011), sendo que a diferenciação espontânea e a morte celular são mais expressivas nas

culturas em suspensão, uma vez que nem todas as células recebem o aporte suficiente de nutrientes, enquanto que a cultura aderente proporciona acesso uniforme à fatores de crescimento, suprimido a diferenciação e permitindo a expansão das populações puras de CT (HILL *et al.*, 2012).

Desta forma, decidimos avaliar se as células aderentes obtidas após cultivo com o meio com EGF e FGF2, apresentariam a mesma potencialidade observada nas esferas. Comparamos o perfil imunofenotípico das células aderentes obtidas com este protocolo de cultivo com as cultivadas em meio padrão. As análises revelaram aumento na proporção de células positivas para os marcadores de pluripotência Sox2, Oct4, Nanog e para os marcadores neurais Nestina e p75NTR na presença de EGF e FGF2, sugerindo que estes fatores possam estar mantendo as células em um estado mais indiferenciado. Os resultados sugerem ainda que possivelmente seja um estado mais comprometido com a linhagem neural, uma vez que as CTMD passaram a expressar Mash1 e FoxD3, fatores envolvidos com a especificação neuronal. Além disso, houve aumento na proporção de células positivas para os marcadores neuronais β -tubulina III, NFM e NSE. Em relação aos marcadores gliais, as CTMD passaram a expressar p0 (marcador de célula de Schwann) e CNPase (marcador de oligodendrócito), além disso observamos aumento na proporção de células positivas para o marcador astrocitário GFAP. Em contrapartida, houve redução no número de células positivas para o marcador de músculo liso α -SMA, sugerindo redução do potencial mesenquimal. Sendo assim, nossos resultados corroboram os trabalhos anteriores, que sugerem que os fatores de crescimento FGF2 e o EGF estimulam a proliferação e potencialidade neural das SKP (TOMA *et al.*, 2005).

Em conjunto os resultados sugerem que, o meio com EGF e FGF2 direciona as CTMD para um estado indiferenciado e comprometido com o fenótipo neural às expensas do mesenquimal, uma vez que estimula a expressão de marcadores de pluripotência, marcadores neurais precoces, e marcadores neuronais e gliais em detrimento do muscular liso. É importante ressaltar que as CTMD aderentes mantidas nessas condições de cultivo, apresentam fenótipo similar aos das esferas, sugerindo que possam representar uma alternativa para possível uso em terapia celular.

5.3.2. Diferenciação neuronal das CTMD

Os resultados indicam que, apesar de EGF e FGF2 estimular o potencial neural das CTMD, não promovem diferenciação neuronal efetiva. Assim, procedemos a um novo protocolo de cultivo onde o tratamento com EGF e FGF2 foi seguido de uma etapa de indução com fatores neurogênicos. Como resultado observamos redução na proporção de células positivas para Nestina, p75NTR e CNPase e supressão na expressão de FoxD3 e p0, embora a de Mash1, β -tubulina III, NFM, NSE e GFAP não tenha sido alterada. Por outro lado, cerca de 8% das CTMD passaram a expressar GAP43, proteína pré-sináptica envolvida com a neuritogênese e descrita como marcador de neuroplasticidade (LIU *et al.*, 2006). Em conjunto, esses achados são coerentes um estado mais diferenciado e comprometido com o fenótipo neuronal às expensas do glial, embora ainda longe de uma diferenciação neuronal.

O processo completo de diferenciação neuronal compreende uma série de passos sequenciais incluindo proliferação, comprometimento, especificação e diferenciação terminal (TEMPLE, 2001). Assim, uma possível explicação para o perfil fenotípico encontrado em cada protocolo de cultura, é que as combinações de fatores de crescimento e neurotróficos utilizadas resultaram em fases intermédias da diferenciação neuronal, porém não foram suficientes para promover a diferenciação neuronal completa (evidências morfológicas, imunocitoquímicas e eletrofisiológicas) das CTMD. É importante considerar que alterações na estrutura celular e a expressão de proteínas neurais por CTM tem sido sugeridas como resultado do estresse celular em resposta à remoção do seu nicho e/ou crescimento em condições alternativas (CROFT; PRZYBORSKI, 2006). Desse modo, protocolos adicionais de diferenciação neuronal acompanhados de análise funcional tornam-se imprescindíveis.

Em conjunto os dados desse trabalho demonstram que as CTMD humanas apresentam potencialidade neural *in vitro* e *in vivo* que pode ser estimulada com fatores de crescimento e neurotróficos. As CTMD apresentam ainda potencial de recuperação funcional em modelo animal de lesão medular, que pode ser explorado para uso em terapia celular.

6. CONCLUSÕES

- As células isoladas da derme humana apresentam características de CTM, como a adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, expressão de marcadores mesenquimais e ausência dos hematopoiéticos e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais.
- As CTMD humanas expressam marcadores de pluripotencialidade, neurais e mesenquimais em condição padrão de cultivo.
- As CTMD humanas apresentam potencial neural *in vivo* após xenotransplante em modelo de lesão medular de ratos, promovendo regeneração funcional parcial.
- O potencial neural CTMD humanas pode ser estimulado por EGF e FGF2 que estimulam a expressão de marcadores de pluripotencialidade, neurais precoces e envolvidos com as linhagens neuronal e glial acompanhado de redução no da linhagem mesenquimal.
- O estímulo neurogênico das CTMD humanas previamente tratadas com EGF e FGF2 parece direcioná-las para o destino neuronal às expensas do glial.
- As CTMD humanas apresentam potencial de uso em terapia celular para regeneração neural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIOT, F. et al. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. **Journal of neuroscience research**, v. 58, n. 3, p. 367–78, 1999.

AL-NBAHEEN, M. et al. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. **Stem Cell Rev Rep**, 2012.

ALEXANIAN, A.R., 2010. An efficient method for generation of neural-like cells from adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Regen. Med.** 5, 891–900.

ANTONIC, A. et al. Stem cell transplantation in traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **PLoS biology**, v. 11, n. 12, p. e1001738, dez. 2013.

APPAIX, F. et al. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? **World journal of stem cells**, v. 6, n. 2, p. 134–43, 26 abr. 2014.

BERTRAND, N.; CASTRO, D. S.; GUILLEMOT, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 517–30, jul. 2002a.

BERTRAND, N.; CASTRO, D. S.; GUILLEMOT, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 517–30, jul. 2002b.

BIERNASKIE, J. et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 36, p. 9545–59, 5 set. 2007.

BITTENCOURT, D. A. et al. Fibroblast growth factor 2 promotes the self-renewal of bipotent glial smooth muscle neural crest progenitors. **Stem cells and development**, v. 22, n. 8, p. 1241–51, 15 abr. 2013.

BRESSAN, R. B. et al. EGF-FGF2 stimulates the proliferation and improves the neuronal commitment of mouse epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSCs). **Experimental cell research**, v. 327, n. 1, p. 37–47, 10 set. 2014.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, maio 2009.

CARDOZO, A. J.; GÓMEZ, D. E.; ARGIBAY, P. F. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 427–36, 15 dez. 2012.

CHICKARMANE, V. et al. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. **PLoS computational biology**, v. 2, n. 9, p. e123, 15 set. 2006.

CHINNICI, C. M. et al. **Isolation and Characterization of Multipotent Cells from Human Fetal Dermis**. [s.l.: s.n.]. p. 1–44

COUTU, D. L.; GALIPEAU, J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. **Aging**, v. 3, n. 10, p. 920–33, out. 2011.

CRANE, J. F.; TRAINOR, P. A. Neural crest stem and progenitor cells. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 267–86, jan. 2006.

CROFT, A. P.; PRZYBORSKI, S. A. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 8, p. 1841–51, ago. 2006.

DELCROIX, G. et al. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 80, n. 4-5, p. 213–27, 2010.

DENG, J. et al. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 4, p. 1054–64, abr. 2006.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

DRÉNO, B. Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, v. 135, n.3, p.149-152, 2008.

EBERT ET AL., 2013. EZ spheres: A stable and expandable culture system for the generation of pre-rosette multipotent stem cells from human ESCs and iPSCs. v. 10, n. 3, p. 417–427, 2013.

EDICINE, C. E. T. R. M. Concise Review : Adult Mesenchymal Stem Cells , Adult Neural Crest Stem Cells , and Therapy of Neurological Pathologies : A State of Play. p. 284–296, 2013.

ERIKA PASTRANA, VIOLETA SILVA-VARGAS, F. D. A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay For Stem Cells. v. 8, n. 5, p. 486–498, 2011.

FIBBE, W.E.; NAUTA, A.J.; ROELOFS, H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. **Ann N Y Acad Sci** 1106: 272–278

FOUDAH, D. et al. Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 820821, jan. 2012.

FRANCO LAMBERT, A. P. et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? **Differentiation; research in biological diversity**, v. 77, n. 3, p. 221–8, mar. 2009.

GAJAVELLI, S. et al. BMP signaling initiates a neural crest differentiation program in embryonic rat CNS stem cells. **Experimental neurology**, v. 188, n. 2, p. 205–23, ago. 2004.

GARCEZ, R. C. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087–91, dez. 2009a.

GARCEZ, R. C. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087–91, dez. 2009b.

HAO, P. et al. Conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells mediates protection in neurons following glutamate excitotoxicity by regulating energy metabolism and GAP-43 expression. **Metabolic brain disease**, v. 29, n. 1, p. 193–205, mar. 2014.

HARDY, S. A; MALTMAN, D. J.; PRZYBORSKI, S. A. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. **Current stem cell research & therapy**, v. 3, n. 1, p. 43–52, jan. 2008.

HILL, R. P. et al. Generation and Characterization of Multipotent Stem Cells from Established Dermal Cultures. v. 7, n. 11, 2012a.

HILL, R. P. et al. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50742, jan. 2012b.

HUANG, H. et al. Multilineage Differentiation Potential of Fibroblast-Like Stromal Cells Derived from Human Skin. v. 00, n. 00, 2010.

HUNT, D. P. J.; JAHODA, C.; CHANDRAN, S. Multipotent skin-derived precursors : from biology to clinical translation. 2009.

JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89542, jan. 2014.

KAGEYAMA, R. et al. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. **Experimental cell research**, v. 306, n. 2, p. 343–8, 10 JUN. 2005.

NAKAMURA, Y. et al. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells** 25:612–620. 2007.

KIM, E. J. et al. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e18472, jan. 2011.

KITADA, M. Mesenchymal cell populations: development of the induction systems for Schwann cells and neuronal cells and finding the unique stem cell population. **Anatomical science international**, v. 87, n. 1, p. 24–44, mar. 2012.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, jan. 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing and Fibrosis. In Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Diseases, 7th edition, Elseviers Saunders, London;. Chapter 3: p. 87-118, 2005.

KURODA, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 19, p. 8639–43, 11 maio 2010.

KWON, B. K. et al. Demonstrating efficacy in preclinical studies of cellular therapies for spinal cord injury - How much is enough? **Experimental neurology**, v. 248C, p. 30–44, 29 maio 2013.

MCKENZIE, I. A et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 24, p. 6651–60, 14 jun. 2006.

MIKAMI, Y. et al. CD271/p75NTR Inhibits the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Adipogenic, Chondrogenic, and Myogenic Lineages. v. 20, n. 5, 2011.

MOTHE, A. J.; TATOR, C. H. Science in medicine Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. v. 122, n. 11, 2012.

MOTHE, A. J.; TATOR, C. H. Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 7, p. 701–13, nov. 2013.

NAKAJIMA, Y. et al. Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 209, n. 3, p. 296–309, jul. 1997.

NELMS, B. L.; LABOSKY, P. A. **Transcriptional Control of Neural Crest Development**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 1–227

OKOLICSANYI, R. K.; GRIFFITHS, L. R.; HAUPT, L. M. Mesenchymal stem cells, neural lineage potential, heparan sulfate

proteoglycans and the matrix. **Developmental biology**, v. 388, n. 1, p. 1–10, 1 abr. 2014.

PERROT, R. et al. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. **Molecular neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 27–65, ago. 2008.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 11, p. 2896–902, nov. 2007.

REN, Y.; YOUNG, W. Managing inflammation after spinal cord injury through manipulation of macrophage function. **Neural plasticity**, v. 2013, p. 945034, jan. 2013.

RIEKSTINA, U.; CAKSTINA, I.; PARFEJEVS, V. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow , Adipose Tissue , Heart and Dermis. p. 378–386, 2009.

SALEWSKI, R.; EMRANI, H.; FEHLINGS, M. G. Neural Stem / Progenitor Cells for Spinal Cord Regeneration. [s.d.].

SILVA, N. A et al. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. **Progress in neurobiology**, 20 nov. 2013.

TOMA, J. G. et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 6, p. 727–37, 2005.

VARMA, A. K. et al. Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. **Neurochemical research**, v. 38, n. 5, p. 895–905, maio 2013.

WALSH, S. K. et al. Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. **Experimental neurology**, v. 223, n. 1, p. 221–8, maio 2010.

WANG, K. et al. Over-expression of Mash1 improves the GABAergic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. **Brain research bulletin**, v. 99, p. 84–94, out. 2013.

WEI, A. et al. The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs. *J Orthop Res* 27:374–379. 2009.

YANG, L.-L. et al. Differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neural-like cells by co-culture with retinal pigmented epithelial cells. **International journal of ophthalmology**, v. 3, n. 1, p. 23–7, jan. 2010.

ZABIEROWSKI, S. E. et al. Dermis-derived stem cells: a source of epidermal melanocytes and melanoma? **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 3, p. 422–9, jun. 2011.

ZHANG, W. et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Stem cells and development**. 13(3):263-71, 2004.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–28, 2001.

